

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202490237 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.03.15

(51) Int. Cl. C12N 15/86 (2006.01)
C12N 15/87 (2006.01)
A61K 38/51 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.07.13

(54) ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ RETGC

(31) 63/221,883

(32) 2021.07.14

(33) US

(86) PCT/IB2022/056458

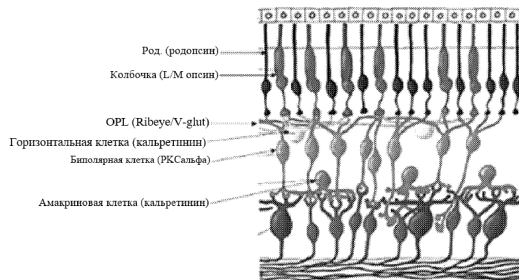
(87) WO 2023/285987 2023.01.19

(71) Заявитель:
МЕЙРАДЖИТИЭКС ЮКЕЙ П
ЛИМИТЕД (GB)

(72) Изобретатель:
Георгиадис Анастасиос (GB)

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

(57) В данном документе предложены экспрессирующие конструкции, вирусные геномы и векторы для экспрессии гуанилилциклазы мембраны сетчатки 1 (RetGC1), а также фармацевтические композиции, содержащие раскрытые в данном документе векторы. Также предоставлены способы применения экспрессирующих конструкций и векторов, раскрытых в данном документе, включая способы лечения заболевания сетчатки у субъекта, нуждающегося в этом, где заболевание сетчатки связано с одной или более мутациями в гене GUCY2D, причем способ включает введение субъекту вектора, раскрытого в данном документе.



202490237
A1

202490237

A1

ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ RETGC

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0001] Настоящее изобретение в целом относится к области молекулярной биологии и медицины. Более конкретно, настоящее изобретение предлагает композиции и способы генной терапии для лечения заболеваний сетчатки.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0002] Гуанилилциклаза мембраны сетчатки (RetGC) расположена в мембранах дисков внешних сегментов фоторецепторов и является одним из ключевых ферментов в физиологии фоторецепторов, продуцируя в палочках и колбочках млекопитающих второй мессенджер фототрансдукции - циклический гуанозинмонофосфат (цГМФ). Во время возбуждения и восстановления фоторецепторов два изофермента RetGC RetGC1 и RetGC2 (также известные как GC-E и GC-F или ROSGC1 и ROSGC2, соответственно), жестко регулируются посредством кальциевой обратной связи, опосредованной белками, активирующими гуанилилциклазу (GCAP).

[0003] Известно, что более 100 мутаций в GUCY2D, гене, кодирующем RetGC, вызывают два основных заболевания: аутосомно-рецессивный врожденный амавроз Лебера типа 1 (arLCA или LCA1) или аутосомно-доминантную колбочко-палочковую дистрофию (adCRD). При CRD дегенерация начинается в колбочках и приводит к потере центрального поля зрения из-за большого количества колбочек в желтом пятне непораженной сетчатки. CRD может привести к полной слепоте, когда дегенерация палочек следует за дегенерацией колбочек. Фенотип LCA1 выглядит еще более тяжелым: потеря функции фоторецепторов и слепота возникают очень рано в жизни.

[0004] Соответственно, срочно необходимы новые методы лечения заболеваний сетчатки, связанных с мутациями GUCY2D (включая без ограничения LCA1 и CRD).

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0005] В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает экспрессирующую конструкцию, содержащую (а) промоторную последовательность, которая обеспечивает экспрессию в фоторецепторных клетках, и (b) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую гуанилилциклазу 1 мембраны сетчатки (RetGC1), причем последовательность нуклеиновой кислоты функционально связана с промотором.

[0006] В одном варианте осуществления промоторная последовательность представляет собой промоторную последовательность родопсинкиназы (RK) или цитомегаловируса (CMV).

[0007] В одном варианте осуществления промоторная последовательность содержит

последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO:7. В одном варианте осуществления промоторная последовательность содержит SEQ ID NO:7.

[0008] В одном варианте осуществления промоторная последовательность содержит последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO:8. В одном варианте осуществления промоторная последовательность содержит SEQ ID NO:8.

[0009] В одном варианте осуществления экспрессирующая конструкция дополнительно содержит посттранскрипционный регуляторный элемент. В одном варианте осуществления посттранскрипционный регулятор содержит посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE). В одном варианте осуществления посттранскрипционный регуляторный элемент содержит последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO:10. В одном варианте осуществления посттранскрипционный регуляторный элемент содержит SEQ ID NO:10.

[0010] В одном варианте осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая RetGC1, представляет собой кодирующую последовательность (cds) гена RetGC1 дикого типа (GUCY2D). В одном варианте осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая RetGC1, представляет собой кодон-оптимизированную последовательность. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая RetGC1, содержит последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO:9. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая RetGC1, содержит SEQ ID NO:9. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая RetGC1, содержит последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO:13. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая RetGC1, содержит SEQ ID NO:13. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая RetGC1, содержит последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO:14. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая RetGC1, содержит SEQ ID NO:14. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая RetGC1, кодирует белок, содержащий последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO:12. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая RetGC1, кодирует белок, содержащий SEQ ID NO: 12.

[0011] В одном варианте осуществления экспрессирующая конструкция дополнительно содержит сигнал полиаденилирования. В вариантах осуществления сигнал полиаденилирования включает сигнал полиаденилирования бычьего гормона роста (BGH-

полиА). В одном варианте осуществления сигнал полиаденилирования содержит последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO:11. В одном варианте осуществления сигнал полиаденилирования содержит SEQ ID NO:11.

[0012] В некоторых вариантах осуществления экспрессирующая конструкция содержит последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:1-4. В некоторых вариантах осуществления экспрессирующая конструкция содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:1-4.

[0013] В одном аспекте предложен вектор, содержащий экспрессирующую конструкцию, описанную в данном документе. В вариантах осуществления вектор представляет собой вирусный вектор. В одном варианте осуществления вектор представляет собой вектор аденоассоциированного вируса (AAV). В одном варианте осуществления вектор содержит геном, полученный из серотипа AAV2 AAV. В одном варианте осуществления вектор содержит капсид, полученный из AAV7m8.

[0014] В одном аспекте предложена фармацевтическая композиция, содержащая раскрытый в данном документе вектор и фармацевтически приемлемый носитель.

[0015] В одном аспекте предложен способ лечения заболевания сетчатки у субъекта, нуждающегося в этом, где заболевание сетчатки связано с одной или более мутациями в гене GUCY2D, при этом способ включает введение субъекту раскрытых в данном документе вектора или фармацевтической композиции. В некоторых вариантах осуществления заболевание сетчатки представляет собой колбочково-палочковую дистрофию (CRD) или врожденный амавроз Лебера типа 1 (LCA1). В одном варианте осуществления заболеванием сетчатки является LCA1.

[0016] В одном аспекте предложен способ увеличения экспрессии цГМФ-специфической субъединицы β 3',5'-циклической фосфодиэстеразы (PDE6 β) палочки у субъекта, нуждающегося в этом, причем способ включает введение субъекту раскрытых в данном документе вектора или фармацевтической композиции.

[0017] В одном аспекте предложен способ повышения уровней циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ) в фоторецепторе у субъекта, нуждающегося в этом, причем способ включает введение субъекту вектора или фармацевтической композиции, раскрытых в настоящем документе.

[0018] В вариантах осуществления вектор или фармацевтическую композицию вводят посредством внутриглазной инъекции. В вариантах осуществления вектор или фармацевтическую композицию вводят в центральную часть сетчатки субъекта.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0019] На фиг. 1 представлена схема сетчатки человека, показывающая слои клеток.

[0020] На фиг. 2 показаны органоиды дикого типа (WT) и RetGC KO iPSC-сетчатки на 20 неделе. Верхний ряд: изображения в светлом поле, показывающие целые органоиды с «кисточковыми каймами» внешних сегментов на периферийном крае как в WT, так и в RetGC KO. Средний ряд. Наружные и внутренние сегменты колбочек и палочек окрашены опсином колбочек и родопсином. Синапсы во внешнем (OPL) и внутреннем плексиформном слое (IPL) окрашиваются Ribeye и VGlut. Биполярные и амакриновые/ганглиозные клетки окрашиваются PKCa и кальретинином. RetGC локализован во внешнем сегменте фоторецептора в органоидах WT и отсутствует в органоидах RetGC KO.

[0021] На фиг. 3 показана общая экспрессия белка (вестерн-блоттинг) в цельных органоидах WT и RetGC KO с дня 40 по день 220 в контроле и органоидах RetGC KO (нормализованных по β -тубулину).

[0022] На фиг. 4 показана конструкция четырех кассет трансгена, упакованных в капсиды AAV 7m8. Промоторы RK и CMV включены в ген GUCY2D WT с элементом WPRE или без него и сигналом полиаденилирования бычьего гормона роста (BGH-полиА).

[0023] На фиг. 5 показана интенсивность окрашивания PDE6 в органоидах WT и трансдуцированных RetGC KO. Репрезентативные изображения внешних сегментов органоидов сетчатки, окрашенных родопсином и PDE6 β .

[0024] На фиг. 6 показана количественная иммунофлуоресценция интенсивности окрашивания PDE6 β внутри родопсин-положительных внешних сегментов. Каждая точка представляет собой мозаичное сканирование отдельного органоида. Интенсивность окрашивания выражается в процентах от органоида WT, который был обработан, окрашен и визуализирован на одном и том же блоке.

[0025] На фиг. 7 показаны результаты вестерн-блоттинга для определения экспрессии белка RetGC и β -тубулина (домашнее хозяйство) в органоидах сетчатки после трансдукции векторами 7m8. Показано количественное определение сигнала вестерн-блоттинга для RetGC относительно β -тубулина с помощью радиометрической денситометрии.

[0026] Фиг. 8 иллюстрирует количественное определение концентрации цГМФ [нМ] с помощью анализа FRET. Показания поглощения нормализовали по общему количеству белка [мкг]. Органоиды WT и органоиды с нокаутом RetGC (нетрансдуцированные NT) сравнивали с органоидами, трансдуцированными четырьмя векторами (n = 7 эмбрионных тел (EB) для каждой экспериментальной группы).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[0027] В данном документе представлены экспрессирующие конструкции, вирусные

геномы и векторы для экспрессии гуанилилциклазы 1 мембраны сетчатки (RetGC1), а также способы использования экспрессирующих конструкций, вирусных геномов и векторов для лечения заболевания сетчатки, связанного с одной или несколькими мутациями в гене GUCY2D.

[0028] RetGC

[0029] RetGC катализирует синтез цГМФ в палочках и колбочках фоторецепторов. Таким образом, RetGC играет важную роль в фототрансдукции, обеспечивая пополнение запасов цГМФ во время зрительного цикла.

[0030] Во время возбуждения и восстановления фоторецепторов два изофермента RetGC RetGC1 и RetGC2 (также известные как GC-E и GC-F или ROSGC1 и ROSGC2, соответственно), жестко регулируются посредством кальциевой обратной связи, опосредованной белками, активирующими гуанилилциклазу (GCAP).

[0031] Роль RetGC1 заключается в восполнении уровней цГМФ после воздействия света. В темноте уровни цГМФ поддерживаются на постоянной скорости, с сохранением открытыми каналов, управляемых цГМФ, и поддержанием частичной деполяризации клеток путем обеспечения притока входящего тока. Воздействие света приводит к гидролизу цГМФ и закрытию каналов, способствуя резкому снижению внутриклеточного Ca^{2+} и гиперполяризации клеток. При низких концентрациях Ca^{2+} белки, активирующие гуанилатциклазу (GCAP), стимулируют активность GC1, что приводит к синтезу цГМФ, повторному открытию каналов и восстановлению темнового состояния.

[0032] Когда световой фотон проходит через внешний сегмент, он захватывается опсинами, встроенными в мембрану внешних сегментов. Второй мессенджер цГМФ является основным компонентом сигнальных этапов зрительного цикла. Баланс его синтеза и распада в цитоплазме наружного сегмента контролирует сигнальные этапы зрительного цикла. Он образуется из ГТФ в результате реакции, катализируемой RetGC. цГМФ связывается с каналами, которые обеспечивают приток ионов Ca^{2+} . При световой трансдукции цГМФ гидролизуется с помощью PDE6 до ГМФ, вызывая закрытие каналов цГМФ. Это ингибирует приток Ca^{2+} , концентрация которого снижается по мере вымывания из мембран диска.

[0033] В цикле фототрансдукции фотоны поглощаются родопсином в палочках и опсинами колбочек в колбочках, где 11-цис-ретиаль превращается в полностью транс-ретиаль. Полностью транс-ретиаль активирует альфа-субъединицу G-белка трансдукцина, и при этом ГДФ превращается в ГТФ. Образующийся ГТФ затем активирует гамма-субъединицу фосфодиэстеразы 6 (PDE6), что позволяет ингибировать выработку цГМФ.

Это приводит к закрытию цГМФ-зависимых каналов и, следовательно, останавливает приток ионов кальция. GCAP в темновом состоянии связаны с ионами кальция, что предотвращает их связь с RetGC. Высвобождение Ca^{2+} из GCAP в световом состоянии позволяет GCAP связываться с RetGC и вырабатывать цГМФ. Параллельно с этим полностью транс инактивируется путем фосфорилирования посредством родопсинкиназы и связывания с аррестином. Связанный с G-белком трансдукцином ГТФ снова преобразуется в ГДФ. В дальнейшем весь цикл повторяется.

[0034] RetGC1 кодируется геном GUCY2D у людей и геном Gucy2e у мышей. RetGC2 у людей кодируется геном GUCY2F.

[0035] Мутации в гене GUCY2D, кодирующем RetGC1, приводят к тяжелым заболеваниям сетчатки у людей и, главным образом, к аутосомно-доминантной колбочково-палочковой дистрофии (adCRD) или аутосомно-рецессивному врожденному амаврозу Лебера типа 1 (arLCA). При CRD дегенерация начинается в колбочках и приводит к потере центрального поля зрения из-за большого количества колбочек в желтом пятне непораженной сетчатки. CRD может привести к полной слепоте, когда дегенерация палочек следует за дегенерацией колбочек. Фенотип LCA1 выглядит еще более тяжелым: потеря функции фоторецепторов и слепота возникают очень рано в жизни. Другой ген, участвующий в патогенезе LCA (тип 12), — это rd3, кодирующий белок дегенерации сетчатки 3 (RD3), который является эффективным ингибитором GCAP-опосредованной активации RetGC1 и участвует в транспортировке RetGC1 из внутреннего сегмента во внешний сегмент фоторецепторов.

[0036] Всего описано 144 различных мутаций GUCY2D. Большинство (127 мутаций) приводят к фенотипу LCA у больных пациентов. В то время как мутации, связанные с LCA, обычно являются рецессивными и нулевыми (в основном мутации сдвига рамки считывания, нонсенс-мутации и мутации сплайсинга) и могут затрагивать все домены фермента RetGC, мутации CRD в основном являются доминантными миссенс-мутациями и группируются в «горячей точке», которая соответствует домену димеризации в положениях между E837 и T849.

[0037] Пациенты с LCA1 поступают в течение первого года жизни и обычно описываются как имеющие сниженную остроту зрения, сниженные или не регистрируемые ответы электроретинограммы (ERG), нистагм, пальце-глазные признаки и очевидно нормальное глазное дно. Сообщения о степени дегенерации фоторецепторов, связанной с этим заболеванием, противоречивы. Гистопатологический анализ двух посмертных сетчаток (после преждевременного аборта на сроке 26 недель и донора в возрасте 12 лет) выявил признаки дегенерации фоторецепторов как в палочках, так и в колбочках. Более

поздние исследования с использованием современных методов визуализации при жизни (т. е. оптической когерентной томографии) не выявили явной дегенерации у пациентов в возрасте 53 лет. Более современные исследования показывают, что, несмотря на высокую степень зрительных нарушений, пациенты с LCA1 сохраняют нормальную слоистую архитектуру фоторецепторов, за исключением аномалий наружного сегмента фовеального конуса и, у некоторых пациентов, потери фовеального конуса.

[0038] При CRD нарушение функции палочек менее серьезное, чем нарушение функции колбочек, и может быть обнаружено на более поздних стадиях заболевания, чем дисфункция колбочек. Диагноз устанавливается электрофизиологическим исследованием; функциональные результаты зависят от стадии заболевания и возраста индивидуума. Диагноз колбочково-палочковой дистрофии может быть подтвержден при выявлении потери периферических, а также центральных полей зрения.

[0039] Экспрессирующие конструкции

[0040] В одном аспекте предложена экспрессирующая конструкция, содержащая (а) промоторную последовательность, которая обеспечивает экспрессию в фоторецепторных клетках, и (b) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую гуанилилциклазу мембраны сетчатки (RetGC1), где последовательность нуклеиновой кислоты функционально связана с промотором. В данном документе термин «функционально связанный» относится как к последовательностям контроля экспрессии (например, промоторам), которые смежны с кодирующей последовательностью (cds) для RetGC1, так и к последовательностям контроля экспрессии, которые действуют в транс или на расстоянии, контролируя экспрессию RetGC1. Контролирующие экспрессию последовательности включают соответствующие последовательности инициации, терминации, промотора и энхансера транскрипции; эффективные сигналы процессинга РНК, такие как сигналы сплайсинга и полиаденилирования; последовательности, которые стабилизируют цитоплазматическую мРНК; последовательности, которые повышают эффективность трансляции (т. е. консенсусная последовательность Козак); последовательности, которые повышают стабильность белка; и, при необходимости, последовательности, которые усиливают секрецию и/или процессинг белка.

[0041] В уровне техники известно большое количество последовательностей контроля экспрессии, например, нативных, конститутивных, индуцируемых и/или тканеспецифичных, и их можно использовать для управления экспрессией трансгена RetGC1 (GUCY2D) в зависимости от желаемого типа экспрессии. Для эукариотических клеток последовательности контроля экспрессии обычно включают промотор, энхансер и последовательность полиаденилирования, которые могут включать донорные и

акцепторные сайты сплайсинга. Последовательность полиаденилирования обычно вставляют после последовательности, кодирующей RetGC1, и перед 3'-последовательностью ITR. Другим регуляторным компонентом гAAV, полезным в раскрытых в данном документе способах, является участок внутренней посадки рибосомы (IRES). Последовательность IRES можно использовать для получения более чем одного полипептида из одного транскрипта гена. IRES (или другая подходящая последовательность) используется для получения белка, содержащего более одной полипептидной цепи, или для экспрессии двух разных белков из одной из той же клетки или в ней. Типичным примером IRES является участок внутренней посадки рибосомы полиовируса, который поддерживает экспрессию трансгена в фоторецепторах, RPE и ганглиозных клетках. Предпочтительно IRES расположен в 3'-направлении по отношению к последовательности, кодирующей RetGC1, в векторе гAAV.

[0042] В одном варианте осуществления промоторная последовательность содержит промоторную последовательность родопсинкиназы (RK). В вариантах осуществления промоторная последовательность содержит последовательность, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, 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% или по меньшей мере 99% идентична SEQ ID NO:7. В одном варианте осуществления промоторная последовательность содержит SEQ ID NO:7.

[0043] В одном варианте осуществления промоторная последовательность содержит промоторную последовательность цитомегаловируса (CMV). В вариантах осуществления промоторная последовательность содержит последовательность, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, 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% или по меньшей мере 99% идентична SEQ ID NO:8. В одном варианте осуществления промоторная последовательность содержит SEQ ID NO:8.

[0044] В некоторых вариантах осуществления промотор специфичен для фоторецепторных клеток, то есть промотор обладает активностью в фоторецепторных клетках, но имеет пониженную активность или не имеет активности в других типах клеток.

[0045] В одном варианте осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая RetGC1, представляет собой кодирующую последовательность гена RetGC1 дикого типа (GUCY2D). В одном варианте осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая RetGC1, представляет собой кодон-оптимизированную

последовательность. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая RetGC1, содержит последовательность, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, 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% или по меньшей мере 99% идентична SEQ ID NO:9. В одном варианте осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая RetGC1, содержит SEQ ID NO:9. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая RetGC1, содержит последовательность, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, 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% или по меньшей мере 99% идентична SEQ ID NO:13. В одном варианте осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая RetGC1, содержит SEQ ID NO:13. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая RetGC1, содержит последовательность, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, 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% или по меньшей мере 99% идентична SEQ ID NO:14. В одном варианте осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая RetGC1, содержит SEQ ID NO:14. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая RetGC1, кодирует белок, содержащий последовательность, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, 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% или по меньшей мере 99% идентична SEQ ID NO:12. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая RetGC1, кодирует белок, содержащий SEQ ID NO: 12.

[0046] В одном варианте осуществления экспрессирующая конструкция содержит посттранскрипционный регуляторный элемент. В одном варианте осуществления экспрессирующая конструкция содержит посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE). В некоторых вариантах осуществления посттранскрипционный регуляторный элемент содержит последовательность, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, 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% или по меньшей мере

99% идентична SEQ ID NO:10. В одном варианте осуществления посттранскрипционный регуляторный элемент содержит SEQ ID NO:10.

[0047] В одном варианте осуществления экспрессирующая конструкция содержит сигнал полиаденилирования. В одном варианте осуществления экспрессирующая конструкция содержит сигнал полиаденилирования бычьего гормона роста (BGH-полиА). В некоторых вариантах осуществления сигнал полиаденилирования содержит последовательность, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, 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% или по меньшей мере 99% идентична SEQ ID NO:11. В одном варианте осуществления сигнал полиаденилирования содержит SEQ ID NO:11.

[0048] В одном варианте осуществления экспрессирующая конструкция содержит нуклеиновую кислоту, содержащую один или несколько инвертированных концевых повторов (ITR). В одном варианте осуществления последовательность ITR получена из серотипа 2 AAV. В одном варианте осуществления последовательность 5'-ITR содержит последовательность, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, 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% или по меньшей мере 99% идентична SEQ ID NO:5. В одном варианте осуществления последовательность 5'-ITR содержит SEQ ID NO:5. В одном варианте осуществления последовательность 3'-ITR содержит последовательность, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, 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% или по меньшей мере 99% идентична SEQ ID NO:6. В одном варианте осуществления последовательность 3'-ITR содержит SEQ ID NO:6.

[0049] Векторы

[0050] В одном аспекте предложены рекомбинантные векторы и их применение для введения трансгена или экспрессирующей конструкции в клетку. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные векторы содержат конструкции рекомбинантной ДНК, которые включают дополнительные элементы ДНК, включая сегменты ДНК, которые обеспечивают репликацию ДНК в клетке-хозяине и экспрессию целевого гена в целевых клетках на соответствующих уровнях. Специалисту в данной области техники понятно, что последовательности контроля экспрессии (промоторы, энхансеры и т.п.) выбираются на

основании их способности стимулировать экспрессию целевого гена в целевой клетке. «**Вектор**» в данном документе означает носитель, который содержит полинуклеотид, подлежащий доставке в клетку-хозяин, либо *in vitro*, либо *in vivo*. Неограничивающие примеры векторов включают рекомбинантную плазмиду, дрожжевую искусственную хромосому (YAC), мини-хромосому, мини-кольцо ДНК или вирус (включая полученные из вируса последовательности). Вектор может также относиться к вириону, содержащему нуклеиновую кислоту, которую необходимо доставить в клетку-хозяина либо *in vitro*, либо *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления вектор относится к вириону, содержащему рекомбинантный вирусный геном, причем вирусный геном содержит один или несколько ITR и трансген.

[0051] В одном варианте осуществления рекомбинантный вектор представляет собой вирусный вектор или комбинацию нескольких вирусных векторов.

[0052] В одном аспекте предложен вектор, содержащий любую из экспрессирующих конструкций, раскрытых в данном документе.

[0053] В одном аспекте предложен вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, содержащую (a) промоторную последовательность, обеспечивающую экспрессию в фоторецепторных клетках, и (b) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую RetGC1, причем последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая RetGC1, функционально связана с промотором.

[0054] В одном варианте осуществления промоторная последовательность содержит промоторную последовательность RK. В некоторых вариантах осуществления промоторная последовательность содержит последовательность, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, 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% или по меньшей мере 99% идентична SEQ ID NO:7. В одном варианте осуществления промоторная последовательность содержит SEQ ID NO:7.

[0055] В одном варианте осуществления промоторная последовательность содержит промоторную последовательность CMV. В некоторых вариантах осуществления промоторная последовательность содержит последовательность, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, 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% или по меньшей мере 99% идентична SEQ ID NO:8. В одном варианте осуществления промоторная последовательность содержит SEQ ID NO:8.

[0056] В некоторых вариантах осуществления промотор специфичен для фоторецепторных клеток.

[0057] В одном варианте осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая RetGC1, представляет собой кодирующую последовательность гена RetGC1 дикого типа (GUCY2D). В одном варианте осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая RetGC1, представляет собой кодон-оптимизированную последовательность. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая RetGC1, содержит последовательность, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, 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% или по меньшей мере 99% идентична SEQ ID NO:9. В одном варианте осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая RetGC1, содержит SEQ ID NO:9. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая RetGC1, содержит последовательность, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, 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% или по меньшей мере 99% идентична SEQ ID NO:13. В одном варианте осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая RetGC1, содержит SEQ ID NO:13. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая RetGC1, содержит последовательность, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, 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% или по меньшей мере 99% идентична SEQ ID NO:14. В одном варианте осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая RetGC1, содержит SEQ ID NO:14. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая RetGC1, кодирует белок, содержащий последовательность, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, 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% или по меньшей мере 99% идентична SEQ ID NO:12. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая RetGC1, кодирует белок, содержащий SEQ ID NO: 12.

[0058] В одном варианте осуществления вектор содержит нуклеиновую кислоту, содержащую посттранскрипционный регуляторный элемент. В одном варианте

осуществления вектор содержит нуклеиновую кислоту, содержащую WPRE. В некоторых вариантах осуществления посттранскрипционный регуляторный элемент содержит последовательность, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, 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% или по меньшей мере 99% идентична SEQ ID NO:10. В одном варианте осуществления посттранскрипционный регуляторный элемент содержит SEQ ID NO:10.

[0059] В одном варианте осуществления вектор содержит нуклеиновую кислоту, содержащую сигнал полиаденилирования. В одном варианте осуществления вектор содержит нуклеиновую кислоту, содержащую сигнал BGH-полиА. В некоторых вариантах осуществления сигнал полиаденилирования содержит последовательность, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, 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% или по меньшей мере 99% идентична SEQ ID NO:11. В одном варианте осуществления сигнал полиаденилирования содержит SEQ ID NO:11.

[0060] В одном варианте осуществления вектор содержит нуклеиновую кислоту, содержащую один или более инвертированных концевых повторов (ITR). В одном варианте осуществления последовательность ITR получена из серотипа 2 AAV. В одном варианте осуществления последовательность 5'-ITR содержит последовательность, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, 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% или по меньшей мере 99% идентична SEQ ID NO:5. В одном варианте осуществления последовательность 5'-ITR содержит SEQ ID NO:5. В одном варианте осуществления последовательность 3'-ITR содержит последовательность, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, 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% или по меньшей мере 99% идентична SEQ ID NO:6. В одном варианте осуществления последовательность 3'-ITR содержит SEQ ID NO:6.

[0061] В некоторых вариантах осуществления вектор содержит нуклеиновую кислоту, содержащую последовательность, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, 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% или по меньшей мере 99% идентична SEQ ID NO: 1-4. В некоторых

вариантах осуществления вектор содержит нуклеиновую кислоту, содержащую последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:1-4.

[0062] В одном варианте осуществления предложен вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, содержащую одно или более из

- (a) промоторной последовательности, содержащей последовательность промотора RK;
- (b) последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей RetGC1, причем последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая RetGC1, функционально связана с промотором;
- (c) WPRE;
- (d) сигнала BGH-полиА и
- (e) одного или более ITR. В некоторых вариантах осуществления вектор содержит две последовательности ITR.

[0063] В одном варианте осуществления предложен вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, содержащую одно или более из

- (a) промоторной последовательности, содержащей последовательность промотора CMV;
- (b) последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей RetGC1, причем последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая RetGC1, функционально связана с промотором;
- (c) WPRE;
- (d) сигнала BGH-полиА и
- (e) одного или более ITR. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержит две последовательности ITR.

[0064] В одном варианте осуществления предложен вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, содержащую одно или более из

- (a) промоторной последовательности, содержащей последовательность, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, 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% или по меньшей мере 99% идентична SEQ ID NO:7;
- (b) последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей RetGC1, при этом последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая RetGC1, функционально связана с промотором, и при этом последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая RetGC1, содержит последовательность, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, 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% или по меньшей мере 99% идентична SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:13 или SEQ ID NO:14;

(c) посттранскрипционного регуляторного элемента, содержащего последовательность, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, 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% или по меньшей мере 99% идентична SEQ ID NO:10;

(d) сигнала полиаденилирования, содержащего последовательность, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, 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% или по меньшей мере 99% идентична SEQ ID NO:11; и

(e) одного или более ITR. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержит две последовательности ITR.

[0065] В одном варианте осуществления предложен вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, содержащую одно или более из

(a) промоторной последовательности, содержащей последовательность, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, 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% или по меньшей мере 99% идентична SEQ ID NO:8;

(b) последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей RetGC1, при этом последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая RetGC1, функционально связана с промотором, и при этом последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая RetGC1, содержит последовательность, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, 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% или по меньшей мере 99% идентична SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:13 или SEQ ID NO:14;

(c) посттранскрипционного регуляторного элемента, содержащего последовательность, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, 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% или по меньшей мере 99% идентична SEQ ID NO:10;

(d) сигнала полиаденилирования, содержащего последовательность, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, 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% или по меньшей мере 99% идентична SEQ ID NO:11; и

(e) одного или более ITR. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержит две последовательности ITR.

[0066] В одном варианте осуществления предложен вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, содержащую одно или более из

(a) промоторной последовательности, содержащей последовательность, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, 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% или по меньшей мере 99% идентична SEQ ID NO:7;

(b) последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей белок RetGC1, причем белок RetGC1 содержит последовательность, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, 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% или по меньшей мере 99% идентична SEQ ID NO:12, и при этом последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая белок RetGC1, функционально связана с промотором;

(c) посттранскрипционного регуляторного элемента, содержащего последовательность, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, 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% или по меньшей мере 99% идентична SEQ ID NO:10;

(d) сигнала полиаденилирования, содержащего последовательность, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, 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% или по меньшей мере 99% идентична SEQ ID NO:11; и

(e) одного или более ITR. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержит две последовательности ITR.

[0067] В одном варианте осуществления предложен вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, содержащую одно или более из

(a) промоторной последовательности, содержащей последовательность, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, 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% или по меньшей мере 99% идентична SEQ ID NO:8;

(b) последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей белок RetGC1, причем белок RetGC1 содержит последовательность, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, 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% или по меньшей мере 99% идентична SEQ ID NO:12, и при этом последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая белок RetGC1, функционально связана с промотором;

(c) посттранскрипционного регуляторного элемента, содержащего последовательность, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, 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% или по меньшей мере 99% идентична SEQ ID NO:10;

(d) сигнала полиаденилирования, содержащего последовательность, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, 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% или по меньшей мере 99% идентична SEQ ID NO:11; и

(e) одного или более ITR. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержит две последовательности ITR.

[0068] В одном варианте осуществления предложен вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, содержащую одно или более из

(a) промоторной последовательности, содержащей SEQ ID NO:7;

(b) последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей RetGC1, при этом последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая RetGC1, функционально связана с промотором, и при этом последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая RetGC1, содержит SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:13 или SEQ ID NO:14;

(c) посттранскрипционного регуляторного элемента, содержащего SEQ ID NO:10;

(d) сигнала полиаденилирования, содержащего последовательность SEQ ID NO:11; и

(e) одного или более ITR. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержит две последовательности ITR.

[0069] В одном варианте осуществления предложен вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, содержащую одно или более из

- (a) промоторной последовательности, содержащей SEQ ID NO:8;
- (b) последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей RetGC1, при этом последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая RetGC1, функционально связана с промотором, и при этом последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая RetGC1, содержит SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:13 или SEQ ID NO:14;
- (c) посттранскрипционного регуляторного элемента, содержащего SEQ ID NO:10;
- (d) сигнала полиаденилирования, содержащего последовательность SEQ ID NO:11; и
- (e) одного или более ITR. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержит две последовательности ITR.

[0070] В одном варианте осуществления предложен вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, содержащую одно или более из

- (a) промоторной последовательности, содержащей SEQ ID NO:7;
- (b) последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей белок RetGC1, при этом белок RetGC1 содержит SEQ ID NO:12, и при этом последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая белок RetGC1, функционально связана с промотором;
- (c) посттранскрипционного регуляторного элемента, содержащего SEQ ID NO:10;
- (d) сигнала полиаденилирования, содержащего последовательность SEQ ID NO:11; и
- (e) одного или более ITR. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержит две последовательности ITR.

[0071] В одном варианте осуществления предложен вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, содержащую одно или более из

- (a) промоторной последовательности, содержащей SEQ ID NO:8;
- (b) последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей белок RetGC1, при этом белок RetGC1 содержит SEQ ID NO:12, и при этом последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая белок RetGC1, функционально связана с промотором;
- (c) посттранскрипционного регуляторного элемента, содержащего SEQ ID NO:10;
- (d) сигнала полиаденилирования, содержащего последовательность SEQ ID NO:11; и
- (e) одного или более ITR. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержит две последовательности ITR.

[0072] Вирусные векторы

[0073] Вирусные векторы для экспрессии целевого гена в целевой клетке, ткани или организме известны в уровне техники и включают, например, вектор AAV, аденовирусный

вектор, лентивирусный вектор, ретровирусный вектор, поксвирусный вектор, бакуловирусный вектор, вектор вируса простого герпеса, вектор вируса коровьей оспы или синтетический вирусный вектор (например, химерный вирус, вирус мозаики или псевдотипированный вирус и/или вирус, который содержит чужеродный белок, синтетический полимер, наночастицу или небольшую молекулу).

[0074] Векторы AAV

[0075] Аденоассоциированные вирусы (AAV) представляют собой небольшие одноцепочечные ДНК-вирусы, которым для облегчения эффективной репликации требуется хелперный вирус. Геном AAV размером 4,7 т.п.н. характеризуется двумя инвертированными концевыми повторами (ITR) и двумя открытыми рамками считывания, которые кодируют белки Rep и белки Cap, соответственно. Рамка считывания Rep кодирует четыре белка с молекулярной массой 78 кДа, 68 кДа, 52 кДа и 40 кДа. Эти белки функционируют главным образом в регуляции репликации AAV, восстановлении и интеграции AAV в хромосомы клетки-хозяина. Рамка считывания Cap кодирует три структурных белка с молекулярной массой 85 кДа (VP1), 72 кДа (VP2) и 61 кДа (VP3), которые образуют капсид вириона. Более 80% всех белков вириона AAV содержат VP3. По бокам открытых рамок считывания гер и сар на 5'- и 3'-концах находятся инвертированные концевые повторы (ITR) длиной около 145 т. п. н. Два ITR являются единственными цис-элементами, необходимыми для репликации, восстановления, упаковки и интеграции генома AAV. Целые домены гер и сар могут быть вырезаны и заменены терапевтическим или репортерным трансгеном.

[0076] Векторы рекомбинантного аденоассоциированного вируса «гAAV» включают любой вектор, полученный из любого серотипа аденоассоциированного вируса. Векторы гAAV могут иметь полностью или частично удаленные один или несколько генов AAV дикого типа, предпочтительно гены Rep и/или Cap, но сохранять функциональные фланкирующие последовательности ITR.

[0077] В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вирион гAAV, который содержит геном гAAV и один или несколько капсидных белков. В некоторых вариантах осуществления геном гAAV содержит экспрессионную кассету, описанную в данном документе.

[0078] В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор, раскрытый в данном документе, содержит нуклеиновую кислоту, содержащую 5'-ITR и 3'-ITR AAV, расположенные в 5'-направлении и 3'-направлении по отношению к последовательности, кодирующей RetGC1, соответственно. Однако в некоторых вариантах осуществления может быть желательно, чтобы нуклеиновая кислота содержала последовательности 5'-ITR

и 3'-ITR, расположенные тандемно, например, от 5' к 3' или по схеме «голова к хвосту», или в другой альтернативной конфигурации. В других вариантах осуществления может быть желательно, чтобы нуклеиновая кислота содержала несколько копий ITR или имела 5'-ITR (или, наоборот, 3'-ITR), расположенные как в 5'-, так и 3'-направлении по отношению к последовательности, кодирующей RetGC1. Последовательности ITR могут располагаться непосредственно выше и/или ниже гетерологичной молекулы или могут представлять собой промежуточные последовательности. ITR не обязательно должны быть нуклеотидными последовательностями дикого типа и могут быть изменены (например, путем вставки, делеции или замены нуклеотидов) при условии, что последовательности обеспечивают функциональное спасение, репликацию и упаковку. ITR могут быть выбраны из AAV2 или из других серотипов AAV, как описано в данном документе.

[0079] В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор AAV, такой как AAV1 (т. е. AAV, содержащий ITR AAV1 и капсидные белки AAV1), AAV2 (т. е. AAV, содержащий ITR AAV2 и капсидные белки AAV2), AAV3 (т. е. AAV, содержащий ITR AAV3 и капсидные белки AAV3), AAV4 (т. е. AAV, содержащий ITR AAV4 и капсидные белки AAV4), AAV5 (*т. е.* AAV, содержащий ITR AAV5 и капсидные белки AAV5), AAV6 (*т. е.* AAV, содержащий ITR AAV6 и капсидные белки AAV6), AAV7 (*т. е.* AAV, содержащий ITR AAV7 и капсидные белки AAV7), AAV8 (*т. е.* AAV, содержащий ITR AAV8 и капсидные белки AAV8), AAV9 (*т. е.* AAV, содержащий ITR AAV9 и капсидные белки AAV9), AAVrh74 (*т. е.* AAV, содержащий ITR AAVrh74 и капсидные белки AAVrh74), AAVrh.8 (*т. е.* AAV, содержащий ITR AAVrh.8 и капсидные белки AAVrh.8) или AAVrh.10 (*т. е.* AAV, содержащий ITR AAVrh.10 и капсидные белки AAVrh.10).

[0080] В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой псевдотипированный вектор AAV, содержащий ITR от одного серотипа AAV и капсидные белки от другого серотипа AAV. В некоторых вариантах осуществления псевдотипированный AAV представляет собой AAV2/9 (*т. е.* AAV, содержащий ITR AAV2 и капсидные белки AAV9). В некоторых вариантах осуществления псевдотипированный AAV представляет собой AAV2/10 (*т. е.* AAV, содержащий ITR AAV2 и капсидные белки AAV10).

[0081] В некоторых вариантах осуществления псевдотипированный AAV представляет собой AAV2/7m8 (*т. е.* AAV, содержащий ITR AAV2 и капсидные белки AAV7m8).

[0082] В некоторых вариантах осуществления вектор AAV содержит рекомбинантный капсидный белок, такой как капсидный белок, содержащий химеру одного или более капсидных белков из AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9,

AAV10, AAVrh74, AAVrh.8 или AAVrh.10. В вариантах осуществления капсид представляет собой вариант капсида AAV, такой как вариант AAV2 гAAV2-ретро (SEQ ID NO:44 из WO 2017/218842, включенной в данный документ посредством ссылки).

[0083] В одном аспекте предложен вирусный геном, содержащий нуклеиновую кислоту, содержащую (a) промоторную последовательность, обеспечивающую экспрессию в фоторецепторных клетках, и (b) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую RetGC1, причем последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая RetGC1, функционально связана с промотором.

[0084] В одном варианте осуществления промоторная последовательность содержит промоторную последовательность RK. В некоторых вариантах осуществления промоторная последовательность содержит последовательность, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, 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% или по меньшей мере 99% идентична SEQ ID NO:7. В одном варианте осуществления промоторная последовательность содержит SEQ ID NO:7.

[0085] В одном варианте осуществления промоторная последовательность содержит промоторную последовательность CMV. В некоторых вариантах осуществления промоторная последовательность содержит последовательность, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, 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% или по меньшей мере 99% идентична SEQ ID NO:8. В одном варианте осуществления промоторная последовательность содержит SEQ ID NO:8.

[0086] В некоторых вариантах осуществления промотор специфичен для фоторецепторных клеток.

[0087] В одном варианте осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая RetGC1, представляет собой кодирующую последовательность гена RetGC1 дикого типа (GUCY2D). В одном варианте осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая RetGC1, представляет собой кодон-оптимизированную последовательность. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая RetGC1, содержит последовательность, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, 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% или по меньшей мере

99% идентична SEQ ID NO:9. В одном варианте осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая RetGC1, содержит SEQ ID NO:9. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая RetGC1, содержит последовательность, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, 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% или по меньшей мере 99% идентична SEQ ID NO:13. В одном варианте осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая RetGC1, содержит SEQ ID NO:13. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая RetGC1, содержит последовательность, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, 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% или по меньшей мере 99% идентична SEQ ID NO:14. В одном варианте осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая RetGC1, содержит SEQ ID NO:14. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая RetGC1, кодирует белок, содержащий последовательность, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, 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% или по меньшей мере 99% идентична SEQ ID NO:12. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая RetGC1, кодирует белок, содержащий SEQ ID NO: 12.

[0088] В одном варианте осуществления вирусный геном содержит нуклеиновую кислоту, содержащую посттранскрипционный регуляторный элемент. В одном варианте осуществления вирусный геном содержит нуклеиновую кислоту, содержащую WPRE. В некоторых вариантах осуществления посттранскрипционный регуляторный элемент содержит последовательность, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, 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% или по меньшей мере 99% идентична SEQ ID NO:10. В одном варианте осуществления посттранскрипционный регуляторный элемент содержит SEQ ID NO:10.

[0089] В одном варианте осуществления вирусный геном содержит нуклеиновую кислоту, содержащую сигнал полиаденилирования. В одном варианте осуществления вирусный геном содержит нуклеиновую кислоту, содержащую сигнал BGH-полиА. В

некоторых вариантах осуществления сигнал полиаденилирования содержит последовательность, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, 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% или по меньшей мере 99% идентична SEQ ID NO:11. В одном варианте осуществления сигнал полиаденилирования содержит SEQ ID NO:11.

[0090] В одном аспекте вирусный геном содержит нуклеиновую кислоту, содержащую один или более инвертированных концевых повторов (ITR). В одном варианте осуществления последовательность ITR получена из серотипа 2 AAV. В одном варианте осуществления последовательность 5'-ITR содержит последовательность, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, 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% или по меньшей мере 99% идентична SEQ ID NO:5. В одном варианте осуществления последовательность 5'-ITR содержит SEQ ID NO:5. В одном варианте осуществления последовательность 3'-ITR содержит последовательность, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, 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% или по меньшей мере 99% идентична SEQ ID NO:6. В одном варианте осуществления последовательность 3'-ITR содержит SEQ ID NO:6.

[0091] В некоторых вариантах осуществления вирусный геном содержит нуклеиновую кислоту, содержащую последовательность, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, 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% или по меньшей мере 99% идентична SEQ ID NOS: 1-4. В некоторых вариантах осуществления вирусный геном содержит нуклеиновую кислоту, содержащую последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:1-4.

[0092] В одном варианте осуществления предложен вирусный геном, содержащий нуклеиновую кислоту, содержащую одно или более из

- (a) промоторной последовательности, содержащей последовательность промотора RK;
- (b) последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей RetGC1, причем последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая RetGC1, функционально связана с промотором;
- (c) WPRE;
- (d) сигнала BGH-полиА и

(e) одного или более ITR. В некоторых вариантах осуществления вирусный геном содержит две последовательности ITR.

[0093] В одном варианте осуществления предложен вирусный геном, содержащий нуклеиновую кислоту, содержащую одно или более из

(a) промоторной последовательности, содержащей последовательность промотора CMV;

(b) последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей RetGC1, причем последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая RetGC1, функционально связана с промотором;

(c) WPRE;

(d) сигнала BGH-полиА и

(e) одного или более ITR. В некоторых вариантах осуществления вирусный геном содержит две последовательности ITR.

[0094] В одном варианте осуществления предложен вирусный геном, содержащий нуклеиновую кислоту, содержащую одно или более из

(a) промоторной последовательности, содержащей последовательность, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, 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% или по меньшей мере 99% идентична SEQ ID NO:7;

(b) последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей RetGC1, при этом последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая RetGC1, функционально связана с промотором, и при этом последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая RetGC1, содержит последовательность, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, 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% или по меньшей мере 99% идентична SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:13 или SEQ ID NO:14;

(c) посттранскрипционного регуляторного элемента, содержащего последовательность, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, 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% или по меньшей мере 99% идентична SEQ ID NO:10;

(d) сигнала полиаденилирования, содержащего последовательность, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, 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% или по меньшей мере 99% идентична SEQ ID NO:11; и

(е) одного или более ITR. В некоторых вариантах осуществления вирусный геном содержит две последовательности ITR.

[0095] В одном варианте осуществления предложен вирусный геном, содержащий нуклеиновую кислоту, содержащую одно или более из

(а) промоторной последовательности, содержащей последовательность, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, 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% или по меньшей мере 99% идентична SEQ ID NO:8;

(b) последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей RetGC1, при этом последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая RetGC1, функционально связана с промотором, и при этом последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая RetGC1, содержит последовательность, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, 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% или по меньшей мере 99% идентична SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:13 или SEQ ID NO:14;

(с) посттранскрипционного регуляторного элемента, содержащего последовательность, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, 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% или по меньшей мере 99% идентична SEQ ID NO:10;

(d) сигнала полиаденилирования, содержащего последовательность, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, 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% или по меньшей мере 99% идентична SEQ ID NO:11; и

(е) одного или более ITR. В некоторых вариантах осуществления вирусный геном содержит две последовательности ITR.

[0096] В одном варианте осуществления предложен вирусный геном, содержащий нуклеиновую кислоту, содержащую одно или более из

(а) промоторной последовательности, содержащей последовательность, которая на по

меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, 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% или по меньшей мере 99% идентична SEQ ID NO:7;

(b) последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей белок RetGC1, причем белок RetGC1 содержит последовательность, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, 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% или по меньшей мере 99% идентична SEQ ID NO:12, и при этом последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая белок RetGC1, функционально связана с промотором;

(c) посттранскрипционного регуляторного элемента, содержащего последовательность, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, 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% или по меньшей мере 99% идентична SEQ ID NO:10;

(d) сигнала полиаденилирования, содержащего последовательность, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, 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% или по меньшей мере 99% идентична SEQ ID NO:11; и

(e) одного или более ITR. В некоторых вариантах осуществления вирусный геном содержит две последовательности ITR.

[0097] В одном варианте осуществления предложен вирусный геном, содержащий нуклеиновую кислоту, содержащую одно или более из

(a) промоторной последовательности, содержащей последовательность, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, 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% или по меньшей мере 99% идентична SEQ ID NO:8;

(b) последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей белок RetGC1, причем белок RetGC1 содержит последовательность, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, 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% или по меньшей мере 99% идентична SEQ ID NO:12, и при

этом последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая белок RetGC1, функционально связана с промотором;

(с) посттранскрипционного регуляторного элемента, содержащего последовательность, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, 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% или по меньшей мере 99% идентична SEQ ID NO:10;

(d) сигнала полиаденилирования, содержащего последовательность, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, 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% или по меньшей мере 99% идентична SEQ ID NO:11; и

(е) одного или более ITR. В некоторых вариантах осуществления вирусный геном содержит две последовательности ITR.

[0098] В одном варианте осуществления предложен вирусный геном, содержащий нуклеиновую кислоту, содержащую одно или более из

(a) промоторной последовательности, содержащей SEQ ID NO:7;

(b) последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей RetGC1, при этом последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая RetGC1, функционально связана с промотором, и при этом последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая RetGC1, содержит SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:13 или SEQ ID NO:14;

(с) посттранскрипционного регуляторного элемента, содержащего SEQ ID NO:10;

(d) сигнала полиаденилирования, содержащего последовательность SEQ ID NO:11; и

(е) одного или более ITR. В некоторых вариантах осуществления вирусный геном содержит две последовательности ITR.

[0099] В одном варианте осуществления предложен вирусный геном, содержащий нуклеиновую кислоту, содержащую одно или более из

(a) промоторной последовательности, содержащей SEQ ID NO:8;

(b) последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей RetGC1, при этом последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая RetGC1, функционально связана с промотором, и при этом последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая RetGC1, содержит SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:13 или SEQ ID NO:14;

(с) посттранскрипционного регуляторного элемента, содержащего SEQ ID NO:10;

(d) сигнала полиаденилирования, содержащего последовательность SEQ ID NO:11; и

(е) одного или более ITR. В некоторых вариантах осуществления вирусный геном

содержит две последовательности ITR.

[0100] В одном варианте осуществления предложен вирусный геном, содержащий нуклеиновую кислоту, содержащую одно или более из

- (a) промоторной последовательности, содержащей SEQ ID NO:7;
- (b) последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей белок RetGC1, при этом белок RetGC1 содержит SEQ ID NO:12, и при этом последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая белок RetGC1, функционально связана с промотором;
- (c) посттранскрипционного регуляторного элемента, содержащего SEQ ID NO:10;
- (d) сигнала полиаденилирования, содержащего последовательность SEQ ID NO:11; и
- (e) одного или более ITR. В некоторых вариантах осуществления вирусный геном содержит две последовательности ITR.

[0101] В одном варианте осуществления предложен вирусный геном, содержащий нуклеиновую кислоту, содержащую одно или более из

- (a) промоторной последовательности, содержащей SEQ ID NO:8;
- (b) последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей белок RetGC1, при этом белок RetGC1 содержит SEQ ID NO:12, и при этом последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая белок RetGC1, функционально связана с промотором;
- (c) посттранскрипционного регуляторного элемента, содержащего SEQ ID NO:10;
- (d) сигнала полиаденилирования, содержащего последовательность SEQ ID NO:11; и
- (e) одного или более ITR. В некоторых вариантах осуществления вирусный геном содержит две последовательности ITR.

[0102] Другие вирусные векторы включают аденовирусные (AV) векторы, например, векторы на основе аденовируса человека типа 2 и аденовируса человека типа 5, репликация которых стала дефектной из-за делеций в областях E1 и E3. Транскрипционная кассета может быть вставлена в область E1, что дает рекомбинантный AV-вектор с делецией E1/E3. Аденовирусные векторы также включают хелпер-зависимые аденовирусные векторы высокой емкости (также известные как векторы высокой емкости, «потрошенные» или «выпотрошенные» векторы), которые не содержат вирусных кодирующих последовательностей. Эти векторы содержат цис-действующие элементы, необходимые для репликации и упаковки вирусной ДНК, в основном последовательности инвертированных концевых повторов (ITR) и сигнал упаковки (CY). Эти хелпер-зависимые геномы AV-векторов потенциально могут нести от нескольких сотен пар оснований до примерно 36 т.п.н. чужеродной ДНК.

[0103] Альтернативно можно использовать другие системы, такие как лентивирусные

векторы. Системы на основе лентивирусов могут трансдуцировать как неделящиеся, так и делящиеся клетки, что делает их полезными для применений, нацеленных, например, на неделящиеся клетки ЦНС. Лентивирусные векторы происходят из вируса иммунодефицита человека и, как и этот вирус, интегрируются в геном хозяина, обеспечивая возможность очень долгосрочной экспрессии генов.

[0104] Полинуклеотиды, включая плазмиды, YAC, минихромосомы и миникольца, несущие целевой ген, содержащий экспрессионную кассету, также могут быть введены в клетку или организм с помощью невирусных векторных систем с использованием, например, катионных липидов, полимеров или того и другого в качестве носителей. Для доставки вектора в клетки также можно использовать полимерные системы конъюгированного полимера поли-L-лизина (PLL) и полиэтиленимина (PEI). Другие способы доставки вектора в клетки включают гидродинамическую инъекцию и электропорацию, а также использование ультразвука как для клеточных культур, так и для организмов. Обзор вирусных и невирусных систем доставки генов см. в Nayerossadat, N. et al. (Adv Biomed Res. 2012; 1:27), включенном в данный документ посредством ссылки.

[0105] Получение вириона гAAV

[0106] Вирионы гAAV, раскрытые в данном документе, могут быть сконструированы и получены с использованием материалов и способов, описанных в данном документе, а также тех, которые известны специалистам в данной области техники. Такие способы инженерии, используемые для создания любого варианта осуществления настоящего изобретения, известны специалистам в области манипуляций с нуклеиновыми кислотами и включают генную инженерию, рекомбинантную инженерию и синтетические методики. См., например, Sambrook et al, "Molecular Cloning. A Laboratory Manual", 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1989), и Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, 1989); и международную патентную публикацию WO 95/13598. Кроме того, способы, подходящие для получения кассеты гAAV в аденовирусном капсиде, описаны в патентах США №№ 5856152 и 5871982.

[0107] Вкратце, чтобы упаковать геном гAAV в вирион гAAV, используется клетка-хозяин, содержащая последовательности, необходимые для экспрессии гер AAV и сар AAV или их функциональных фрагментов, а также хелперные гены, необходимые для продуцирования AAV. Последовательности гер и сар AAV получают из источника AAV, указанного в данном документе. Последовательности гер и сар AAV могут быть введены в клетку-хозяина любым способом, известным специалисту в данной области техники, включая без ограничения трансфекцию, электропорацию, липосомную доставку, методики

слияния мембран, высокоскоростные гранулы, покрытые ДНК, вирусную инфекцию и слияние протопластов. В одном варианте осуществления последовательности гер и сар могут быть трансфицированы в клетку-хозяина одной или более молекулами нуклеиновой кислоты и стабильно существовать в клетке в виде эписомы. В другом варианте осуществления последовательности гер и сар стабильно интегрированы в геном клетки. В другом варианте осуществления последовательности гер и сар временно экспрессируются в клетке-хозяине. Например, молекула нуклеиновой кислоты, пригодная для такой трансфекции, содержит в направлении от 5' до 3' промотор, необязательный спейсер, вставленный между промотором и начальным сайтом последовательности гена гер, последовательность гена гер AAV и последовательность гена сар AAV.

[0108] Последовательности гер и сар вместе с их последовательностями контроля экспрессии могут быть предоставлены в одном векторе, или каждая последовательность может быть предоставлена в своем собственном векторе. Предпочтительно, чтобы последовательности гер и сар поставлялись в одном и том же векторе. Альтернативно последовательности гер и сар могут быть включены в вектор, который содержит другие последовательности ДНК, которые необходимо ввести в клетки-хозяева. Предпочтительно промотор, используемый в этой конструкции, может представлять собой любые подходящие конститутивные, индуцируемые или нативные промоторы, известные специалисту в данной области техники. Молекула, обеспечивающая белки гер и сар, может находиться в любой форме, которая переносит эти компоненты в клетку-хозяина. Желательно, чтобы эта молекула была в форме плазмиды, которая может содержать другие невирусные последовательности, например, последовательности маркерных генов. Эта молекула не содержит ITR AAV и, как правило, не содержит упаковочных последовательностей AAV. Чтобы избежать возникновения гомологичной рекомбинации, в этой плазмиде избегают других вирусных последовательностей, особенно аденовируса. Эту плазмиду желательно сконструировать так, чтобы ее можно было стабильно трансфицировать в клетку.

[0109] Хотя молекула, обеспечивающая гер и сар, может быть временно трансфицирована в клетку-хозяина, предпочтительно, чтобы клетка-хозяин была стабильно трансформирована последовательностями, необходимыми для экспрессии функциональных белков гер/сар в клетке-хозяине, например, в виде эписомы или путем интеграции в хромосому клетки-хозяина. В зависимости от промотора, контролирующего экспрессию такой стабильно трансфицированной клетки-хозяина, белки гер/сар могут временно экспрессироваться (например, посредством использования индуцируемого промотора).

[0110] Способы, используемые для создания вариантов осуществления настоящего изобретения, представляют собой традиционные методики генной инженерии или рекомбинантной инженерии, такие как описанные в ссылках выше. Например, гAAV можно получить с использованием способа тройной трансфекции с использованием либо способа с фосфатом кальция (Clontech), либо реагентом Effectene (Qiagen, Валенсия, Калифорния) в соответствии с инструкциями производителя. Способ, использованный в следующих примерах, с использованием плазмиды с трансгеном, хелперной плазмиды, содержащей гер и сар AAV, и плазмиды, обеспечивающую хелперные функции аденовируса E2A, E4Orf6 и VA, см. также в Herzog et al., 1999, Nature Medic., 5(1):56-63. Хотя в настоящем описании представлены иллюстративные примеры конкретных конструкций, используя информацию, представленную в данном документе, специалист в данной области техники может выбрать и спроектировать другие подходящие конструкции, используя выбор спейсеров, промоторов и других элементов, включая по меньшей мере один сигнал начала и прекращения трансляции и необязательное добавление сайтов полиаденилирования.

[0111] Вирионы гAAV затем получают путем культивирования клетки-хозяина, содержащей вирус гAAV, как описано в данном документе, который содержит геном гAAV, подлежащий упаковке в вирион гAAV, последовательность гер AAV и последовательность сар AAV под контролем регуляторных последовательностей, управляющих их экспрессией. Подходящие вирусные хелперные гены, например, аденовирус E2A, E4Orf6 и VA, среди других возможных хелперных генов, могут быть введены в культуру различными способами, известными в уровне техники, предпочтительно на отдельной плазмиде. После этого рекомбинантный вирион AAV, который управляет экспрессией RetGC1 трансгена RetGC1, выделяют из клетки или культуры клеток в отсутствие примеси хелперного вируса или AAV дикого типа.

[0112] Экспрессию трансгена RetGC1 можно определить способами, известными в уровне техники. Например, целевая клетка может быть инфицирована *in vitro*, а количество копий трансгена в клетке контролируют с помощью саузернблоттинга или количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР). Уровень экспрессии РНК можно контролировать с помощью нозернблоттинга или количественной ПЦР с обратной транскриптазой (ОТ); и уровень экспрессии белка можно контролировать с помощью вестернблоттинга, иммуногистохимии, твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), радиоиммунного анализа (RIA) или конкретных методов, подробно описанных ниже в примерах.

[0113] Фармацевтические композиции

[0114] В данном документе предложена фармацевтическая композиция, содержащая любой из раскрытых в данном документе векторов и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

[0115] rAAV, содержащий ген, кодирующий RetGC1, предпочтительно оценивают на загрязнение обычными способами, а затем составляют фармацевтическую композицию, подходящую для хранения и/или введения пациенту.

[0116] Составы векторов, раскрытые в данном документе, включают использование фармацевтически и/или физиологически приемлемой среды-носителя или носителя, особенно подходящего для субретинальной инъекции, такого как забуференный физиологический раствор или другие буферы, например, HEPES, для поддержания pH на соответствующих физиологических уровнях.

[0117] Вектор по настоящему изобретению может быть включен в состав фармацевтических композиций. Эти композиции могут содержать, помимо вектора, фармацевтически и/или физиологически приемлемое вспомогательное вещество, носитель, буфер, стабилизатор, антиоксиданты, консервант или другие добавки, хорошо известные специалистам в данной области техники. Такие материалы должны быть нетоксичными и не должны влиять на эффективность активного ингредиента. Точная природа носителя или другого материала может быть определена специалистом в зависимости от пути введения. Фармацевтическая композиция обычно находится в жидкой форме. Жидкие фармацевтические композиции обычно включают жидкий носитель, такой как вода, нефть, животные или растительные масла, минеральное масло или синтетическое масло. Дополнительные носители представлены в международной патентной публикации № WO 00/15822, включенной в данный документ посредством ссылки. Могут быть включены физиологический солевой раствор, хлорид магния, декстроза или раствор другого сахара или гликоли, такие как этиленгликоль, пропиленгликоль или полиэтиленгликоль. В некоторых случаях можно использовать поверхностно-активное вещество, такое как плурононовая кислота (PF68) 0,001%. В некоторых случаях используют инъекции Рингера, инъекции Рингера с лактатом или раствор Хартманна. При необходимости могут быть включены консерванты, стабилизаторы, буферы, антиоксиданты и/или другие добавки.

[0118] Для отсроченного высвобождения вектор можно включить в фармацевтическую композицию, составленную для медленного высвобождения, например, в микрокапсулы, образованные из биосовместимых полимеров, или в липосомальные системы-носители в соответствии со способами, известными в уровне техники.

[0119] Если вектор предполагается хранить в течение длительного времени, его можно заморозить в присутствии глицерина.

[0120] Способы лечения

[0121] В данном документе предусмотрен способ лечения заболевания сетчатки у субъекта, нуждающегося в этом, где заболевание сетчатки связано с одной или более мутациями в гене GUCY2D, причем способ включает введение субъекту вектора, раскрытого в данном документе. В данном документе также предложен способ лечения заболевания сетчатки у субъекта, нуждающегося в этом, где заболевание сетчатки связано с одной или более мутациями в гене GUCY2D, причем способ включает введение субъекту фармацевтической композиции, содержащей вектор, раскрытый в данном документе. В данном документе предусмотрен вектор для применения в способе лечения заболевания сетчатки у субъекта, нуждающегося в этом, где заболевание сетчатки связано с одной или более мутациями в гене GUCY2D. В некоторых вариантах осуществления субъект несет мутацию в гене GUCY2D.

[0122] В некоторых вариантах осуществления субъектом является млекопитающее. Термин «млекопитающее», используемый в данном документе, включает без ограничения людей, лабораторных животных, домашних питомцев и сельскохозяйственных животных. Млекопитающие включают без ограничения человека или млекопитающего, не являющегося человеком, такого как крупный рогатый скот, лошадь, собака, овца или кошка и т.д. Субъектами по данному изобретению также являются индивидуумы и пациенты.

[0123] Термины «лечить», «получивший лечение», «лечащий» или «лечение», используемые в данном документе, относятся к терапевтическому лечению, целью которого является замедление (уменьшение) нежелательного физиологического состояния, нарушения или заболевания или получение полезных или желаемых клинических результатов. Для целей настоящего изобретения полезные или желаемые клинические результаты включают без ограничения облегчение симптомов; уменьшение степени состояния, нарушения или заболевания; стабилизацию (т. е. отсутствие ухудшения) статуса состояния, нарушения или заболевания; задержку начала или замедление прогрессирования состояния, нарушения или заболевания; облегчение одного или нескольких симптомов состояния, нарушения или болезненного состояния и ремиссию (частичную или полную) или поправку или улучшение состояния, нарушения или заболевания. Лечение включает индуцирование клинически значимого ответа без чрезмерного уровня побочных эффектов. Лечение также включает продление выживаемости по сравнению с ожидаемой выживаемостью в случае отсутствия лечения. Термины «предотвращать», «предотвращение» и т.п. относятся к действиям до явного возникновения заболевания или нарушения, направленным на предотвращение развития заболевания или нарушения, или

на минимизацию степени заболевания или нарушения, или на замедление хода его развития.

[0124] В некоторых вариантах осуществления успех лечения измеряется одним или несколькими из следующих показателей: остротой зрения, ответами электроретинограммы (ЭРГ), уменьшением нистагма, изменениями пальце-глазных признаков и гистопатологическим анализом или оптической когерентной томографией.

[0125] В некоторых вариантах осуществления заболевание сетчатки представляет собой колбочково-палочковую дистрофию (CRD) или врожденный амавроз Лебера типа 1 (LCA1). В одном варианте осуществления заболеванием сетчатки является LCA1. В одном варианте осуществления заболеванием сетчатки является CRD.

[0126] В одном аспекте предложен способ, включающий

- (a) определение того, несет ли субъект мутацию в гене GUCY2D; и
- (b) введение фармацевтической композиции, содержащей раскрытый в данном документе вектор, субъекту, если субъект несет мутацию в гене GUCY2D.

[0127] Путь и способы введения

[0128] В некоторых вариантах осуществления векторы или фармацевтические композиции, раскрытые в данном документе, вводят посредством внутриглазной инъекции. В некоторых вариантах осуществления векторы или фармацевтические композиции, раскрытые в данном документе, вводят путем прямой ретинальной, субретинальной или интравитреальной инъекции. В некоторых вариантах осуществления векторы или фармацевтические композиции, раскрытые в данном документе, вводят в центральную часть сетчатки субъекта.

[0129] Доза вектора по настоящему изобретению может быть определена в соответствии с различными параметрами, особенно в соответствии с возрастом, весом и состоянием пациента, подлежащего лечению, конкретным глазным нарушением и степенью развития нарушения, если оно прогрессирует, путем введения; и необходимым режимом. Опять же, врач сможет определить необходимый путь введения и дозировку для любого конкретного пациента. Эффективное количество гAAV, несущего последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую RetGC1, под контролем промоторной последовательности, желательно находится в диапазоне от примерно 1×10^9 до 2×10^{12} частиц генома гAAV или от 1×10^{10} до 2×10^{11} частиц генома. Частица генома определяется в данном документе как капсид AAV, который содержит одноцепочечную молекулу ДНК, которую можно количественно оценить с помощью метода, специфичного для последовательности (например, ПЦР в реальном времени). В некоторых вариантах осуществления частицы

генома гAAV от примерно 1×10^9 до 2×10^{12} представлены в объеме от примерно 150 до примерно 800 мкл. В некоторых вариантах осуществления частицы генома гAAV от примерно 1×10^{10} до 2×10^{11} представлены в объеме от примерно 250 до примерно 500 мкл. Другие дозировки в этих диапазонах могут быть выбраны лечащим врачом.

[0130] Доза может быть введена в виде однократной дозы, но может быть повторена для парного глаза или в тех случаях, когда вектор по какой-либо причине не попал в нужную область сетчатки (например, из-за хирургического осложнения). Лечение предпочтительно представляет собой однократное постоянное лечение для каждого глаза, но можно рассмотреть возможность повторных инъекций, например, в последующие годы и/или других серотипов AAV. По существу, может оказаться желательным введение нескольких «бустерных» доз фармацевтических композиций, раскрытых в данном документе. Например, в зависимости от продолжительности пребывания трансгена в целевой клетке глаза можно доставлять бустерные дозы с интервалами в 6 месяцев или ежегодно после первого введения. Такие бустерные дозы и необходимость в них могут контролироваться лечащими врачами с использованием, например, тестов на функцию сетчатки и зрительную функции, а также тесты на зрительное поведение, известные в уровне техники. Другие подобные тесты могут быть использованы для определения статуса пролеченного субъекта с течением времени. Выбор подходящих тестов может сделать лечащий врач. Альтернативно, раскрытые в данном документе способы могут также включать инъекцию большего объема раствора, содержащего вектор, при однократной или множественной инфекции, чтобы обеспечить уровни зрительной функции, близкие к тем, которые обнаруживаются в сетчатках дикого типа.

[0131] Дополнительные способы

[0132] В одном аспекте предложен способ увеличения экспрессии цГМФ-специфической субъединицы β 3',5'-циклической фосфодиэстеразы палочки (PDE6 β) у субъекта, нуждающегося в этом, причем способ включает введение субъекту раскрытого в данном документе вектора. В одном аспекте предложен способ увеличения экспрессии цГМФ-специфической субъединицы β 3',5'-циклической фосфодиэстеразы палочки (PDE6 β) в клетке, причем способ включает приведение клетки в контакт с вектором, раскрытым в данном документе.

[0133] В одном аспекте предложен способ повышения уровней цГМФ в фоторецепторе у субъекта, нуждающегося в этом, причем способ включает введение субъекту вектора, раскрытого в данном документе. В одном аспекте предложен способ повышения уровней цГМФ в фоторецепторе в клетке, причем способ включает приведение клетки в контакт с

вектором, раскрытым в данном документе.

[0134] Изделия и наборы

[0135] Также предусмотрены наборы или изделия для применения в способах, описанных в данном документе. В некоторых аспектах наборы содержат композиции, описанные в данном документе (например, композиции для доставки трансгена, кодирующего RetGC1) в подходящей упаковке. Подходящая упаковка для описанных в данном документе композиций (таких как офтальмологические композиции для инъекции) известна в уровне техники и включает, например, флаконы (такие как запечатанные флаконы), сосуды, ампулы, бутылки, банки, гибкую упаковку (например, запечатанную майларовую пленку или полиэтиленовые пакеты) и тому подобное. Эти изделия могут быть дополнительно стерилизованы и/или запечатаны.

[0136] Также предусмотрены наборы, содержащие композиции, описанные в данном документе. Эти наборы могут дополнительно содержать инструкцию(и) по способам применения композиции, например, по применениям, описанным в данном документе. Описанные в данном документе наборы могут дополнительно включать другие материалы, желательные с коммерческой точки зрения и с точки зрения пользователя, включая буферы, разбавители, фильтры, иглы, шприцы и вкладыши в упаковки с инструкциями по выполнению введения композиции или выполнению любых способов, описанных в данном документе. Например, в некоторых вариантах осуществления набор содержит гAAV для экспрессии трансгена, кодирующего RetGC1, в целевых клетках, фармацевтически приемлемый носитель, подходящий для инъекции, и одно или несколько из буфера, разбавителя, фильтра, иглы, шприца и вкладыша в упаковку с инструкцией по выполнению инъекций.

[0137] Следует понимать, что настоящее изобретение не ограничивается описанными конкретными молекулами, композициями, методологиями или протоколами, поскольку они могут различаться. Любые способы и материалы, подобные или эквивалентные описанным в данном документе, могут быть использованы на практике или при тестировании вариантов осуществления настоящего изобретения. Кроме того, следует понимать, что раскрытие настоящего изобретения в этом описании включает все возможные комбинации таких конкретных признаков. Например, если конкретный признак раскрыт в контексте конкретного аспекта или варианта осуществления настоящего изобретения или конкретного пункта формулы изобретения, этот признак также может использоваться, насколько это возможно, в сочетании с и/или в контексте других

конкретных аспектов и вариантов осуществления настоящего изобретения и настоящего изобретения в целом.

[0138] Если в данном документе делается ссылка на способ, включающий два или более определенных этапов, определенные этапы могут выполняться в любом порядке или одновременно (за исключением случаев, когда контекст исключает такую возможность), и способ может включать один или более других этапов, которые выполняются перед любым из определенных этапов, между двумя определенными этапами или после всех определенных этапов (за исключением случаев, когда контекст исключает эти возможности).

[0139] Все остальные патенты и заявки, на которые имеются ссылки, включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Кроме того, если определение или использование термина в ссылке, которая включена в данный документ посредством ссылки, несовместимо или противоречит определению этого термина, представленному в данном документе, применяется определение этого термина, представленное в данном документе, и определение этого термина в ссылке не применяется.

[0140] Чтобы облегчить лучшее понимание настоящего изобретения, приведены следующие примеры конкретных вариантов его осуществления. Следующие примеры не следует рассматривать как ограничивающие или определяющие весь объем настоящего изобретения.

ПРИМЕРЫ

[0141] Пример 1. Создание органоидов с нокаутом RetGC (KO) в качестве модели заболевания *in vitro* для заболеваний сетчатки, связанных с мутациями в GUCY2D

[0142] Для создания органоидов RetGC KO органоиды сетчатки дикого типа (WT) собирали в несколько моментов времени во время развития. Уровни мРНК GUCY2D и белка RetGC измеряли с помощью кПЦР и вестерн-блоттинга/иммунофлуоресценции соответственно в различные моменты времени во время развития органоидов сетчатки наряду со специфичными для сетчатки маркерами. Фибробласты человека WT перепрограммировали и ген редактировали для удаления GUCY2D-RetGC с использованием эписомальных факторов перепрограммирования и CRISPR/CAS9. Клоны KO-индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSC) дифференцировали в органоиды сетчатки наряду с их неотредактированной (WT) изогенной контрольной линией. Подтверждали наличие маркеров фоторецепторов и отсутствие белка RetGC в ожидаемые моменты времени развития.

[0143] Белок RetGC транслоцировали во внешний сегмент фоторецептора сетчатки

млекопитающих. С помощью иммунофлуоресценции белок RetGC можно было обнаружить в структурах внешних сегментов органоидов WT, где он локализовался совместно с родопсином. Потерю белка RetGC в зрелых органоидах RetGC KO подтверждали с помощью иммунофлуоресценции и вестерн-блоттинга. Также наблюдалось значительное снижение мРНК GUCY2D (RetGC).

[0144] Было обнаружено, что помимо потери RetGC во внешнем сегменте, белок фототрансдукции фосфодиэстераза-6-бета (PDE6 β) снижается во внешних сегментах органоидов RetGC KO. PDE6 β играет центральную роль в цикле фототрансдукции. При световой стимуляции цГМФ гидролизуется PDE6 β до ГМФ, вызывая закрытие каналов цГМФ в диске внешнего сегмента, что приводит к гиперполяризации фоторецепторной клетки.

[0145] Приведенные выше свойства органоидов RetGC KO показали, что эти органоиды можно использовать в качестве модели заболевания *in vitro* для проверки эффективности вирусных векторов RetGC для восстановления уровней белка.

[0146] Пример 2. Характеристика органоидов RetGC KO

[0147] Органоиды сетчатки RetGC KO и WT получали из индуцированных человеком плюрипотентных клеток (hiPSC) с использованием установленного протокола дифференциации. Протокол дифференциации позволил получить органоиды сетчатки, которые становятся «зрелыми» в день 140 (20 недель) и могут быть использованы в экспериментах по трансдукции AAV. Зрелые органоиды сетчатки могли сохраняться в культуре до дня 300 (43 недели) без морфологически различимых признаков дегенерации.

[0148] Нейральная сетчатка человека состоит из нескольких слоев нервных клеток, включая горизонтальные клетки, биполярные клетки, амакриновые клетки, мюллерову глию и ганглиозные клетки, фоторецепторы, клетки пигментного эпителия сетчатки (**фиг. 1**). Органоиды, созданные *in vitro*, отражают слоистую морфологию нейральной сетчатки, в которой вышеуказанные типы клеток сетчатки расположены в соответствующих слоях и соединены в двух синаптических слоях.

[0149] Органоиды WT и RetGC KO характеризовали с использованием методик иммунофлуоресценции, вестерн-блоттинга и кПЦР. Соответствующие маркеры для различных типов клеток сетчатки использовали для идентификации и иллюстрации сходства морфологии сетчатки между сетчаткой человека *in vivo* и органоидами сетчатки как в клеточных линиях WT, так и в RetGC KO. **На фиг. 2** показаны криосрезы и иммуноокрашенные изображения LM опсина и родопсина для фоторецепторов колбочек и палочек, Ribeye и V Glut для синапсов во внешнем плексиформном слое, PKC α и

кальретинина для биполярных, горизонтальных и амакриновых клеток. На светлопольных изображениях изображены зрелые органоиды с видимыми «кисточковыми каймами», которые представляют собой внешние сегменты фоторецепторов. На графике на **фиг. 3** показан анализ экспрессии белка RetGC в зависимости от времени развития органоидов сетчатки (с дня 40 по день 220). Уровни белка RetGC значительно снижены в органоидах RetGC KO по сравнению с WT.

[0150] Пример 3. Разработка векторов для восстановления экспрессии RetGC в органоидах KO

[0151] Вирусные векторы, содержащие одну из четырех различных экспрессирующих конструкций, создавали, как показано на **фиг. 4**. Экспрессирующие конструкции имели два разных промотора: RK (полученный из фоторецептор-специфического промотора родопсинкиназы, специфичного для фоторецепторов) и CMV (полученный из цитомегаловируса). Некоторые из экспрессирующих конструкций также содержали посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE). Все вирусные геномы упаковывали в капсид 7m8.

[0152] Органоиды сетчатки WT и RetGC KO трансдуцировали в возрасте от дня 140 до дня 204 четырьмя различными вирусными векторами и инкубировали в течение 21 дня перед сбором и анализом. Трансдуцированные органоиды оценивали с помощью иммунофлуоресценции, вестерн-блоттинга, кПЦР и анализа cGMP FRET.

[0153] Все четыре вектора AAV 7m8 успешно трансдуцировали фоторецепторы человека и стимулировали экспрессию белка RetGC в органоидах сетчатки RetGC KO, что определялось количественным определением общего белка RetGC (вестерн-блоттинг) и мРНК (кПЦР). Трансгенный RetGC, доставленный с помощью 7m8 CMV-RetGC и 7m8 RK-RetGC, выявлялся с помощью иммунофлуоресценции в правильном внутриклеточном компартменте внешнего сегмента фоторецептора.

[0154] Пример 4. Экспрессия RetGC, управляемая вектором AAV, восстанавливает экспрессию PDE6β во внешних сегментах фоторецептора.

[0155] На **фиг. 5** показано иммуноокрашивание PDE6β в органоидах сетчатки WT, нетрансдуцированных и трансдуцированных вирусным вектором. PDE6β окрашивали совместно с белком родопсина, чтобы установить наличие внешних сегментов во всех органоидах и показать, насколько снижено содержание белка PDE6β в нетрансдуцированном контроле по сравнению с контролем WT. После трансдукции вирусными векторами подтверждали восстановление белка PDE6β.

[0156] Наблюдалось значительное снижение интенсивности окрашивания PDE6 β нетрансдуцированного RetGC KO по сравнению с контрольными органоидами сетчатки WT, $p < 0,005$ (применяли однофакторный тест ANOVA с критерием Краскела-Уоллиса для множественных сравнений). Интенсивность окрашивания в родопсин-положительных внешних сегментах количественно оценивали в нескольких органоидах WT, RetGC KO и трансдуцированных органоидах. Экспрессия PDE6 β восстанавливалась близко к уровням WT в органоидах, обработанных 7m8-CMV-RetGC и 7m8-RK-RetGC. 7m8-CMV-RetGC-WPRE и 7m8-RK-RetGC-WPRE показали улучшение по сравнению с KO, но не до такого же уровня, как два других вектора (**фиг. 6 и таблица 1**).

Таблица 1 Восстановление экспрессии PDE6 β во внешних сегментах. SD = стандартное отклонение. $n = 4$ для каждого вектора.

| Вектор | PDE6β по сравнению с WT [%] | PDE6β по сравнению с WT [SD, %] |
|--------------------|-----------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| 7m8-CMV-RetGC | 73 | 22,0 |
| 7m8-RK-RetGC | 75 | 25,7 |
| 7m8-CMV-RetGC-WPRE | 44 | 19,5 |
| 7m8-RK-RetGC-WPRE | 43 | 13,0 |

[0157] Пример 5. Экспрессия RetGC, управляемая вектором AAV, восстанавливает уровни белка RetGC

[0158] Уровни белка RetGC анализировали с помощью вестерн-блоттинга. Как показано на **фиг. 7**, экспрессия RetGC была выше в EB, трансдуцированных векторами 7m8-CMV-RetGC (30% WT), 7m8-CMV-WPRE-RetGC (47% WT) и 7m8-RK-RetGC (27% WT) по отношению к нетрансдуцированным EB. Для каждой экспериментальной группы собирали два образца и обрабатывали их для анализа экспрессии белка.

[0159] Пример 6. Экспрессия RetGC, управляемая вектором AAV, восстанавливает общие уровни цГМФ в органоидах после световой стимуляции

[0160] Для измерения активности RetGC количественное измерение цГМФ проводили в формате конкурентного анализа с использованием специфического антитела, меченного криптоном европия (донор), и цГМФ, меченного реагентом d2 (акцептор). Принцип обнаружения основан на технологии HTRF®. Когда красители находятся в непосредственной близости, возбуждение донора источником света (лазером или лампой-вспышкой) запускает резонансный перенос энергии флуоресценции (FRET) к акцептору,

который, в свою очередь, флуоресцирует на определенной длине волны (665 нм). цГМФ, присутствующий в образце, конкурирует за связывание между двумя конъюгатами и тем самым предотвращает возникновение FRET. Специфический сигнал обратно пропорционален концентрации цГМФ.

[0161] Органоиды WT и KO, трансдуцированные и нетрансдуцированные векторами 7m8, подвергали воздействию цикла свет/темнота, чтобы индуцировать выработку цГМФ. Используемый протокол световой стимуляции состоял из 5 минут стимуляции белым светом и 5 минут темноты перед рассечением органоидов для выделения фоторецепторов. Образцы рассекали и лизировали под красным светом в присутствии IBMX (ингибитора PDE), как описано в протоколе исследования. Анализ определяет концентрацию цГМФ [нМ] относительно стандартной кривой, и полученные значения нормализуют по общему количеству белка [мкг] на образец. Статистический анализ проводили для оценки статистической разницы между образцами по сравнению с контролем без трансдуцирования KO (NT).

[0162] Как показано на графике на **фиг. 8**, органоиды RetGC KO (NT) имели значительное снижение уровней цГМФ после световой стимуляции (20% WT). После трансдукции статистически значимое увеличение цГМФ было обнаружено в органоидах KO RetGC-GUCY2D, трансдуцированных векторами 7m8-CMV-GUCY2D (+76% WT, $p = 0,0043$) и 7m8-RK-GUCY2D (+37% WT, $p = 0,0494$). Трансдукции как векторами CMV, так и RK, несущими элемент WPRE, привели к увеличению цГМФ, которое не было статистически значимым, но со средним значением, сравнимым с тем, которое обнаружено в образцах WT. На графике показаны результаты, полученные в двух отдельных экспериментах с 3 или 4 трансдуцированными органоидами на группу (**фиг. 8**). Наблюдение того, что общие уровни цГМФ соответствовали уровням WT и превышали их, демонстрирует функциональную эффективность этих вышеупомянутых векторов в контексте светочувствительных фоторецепторов человека.

[0163] Обзор последовательностей

| SEQ ID NO | Название | Описание | Последовательность |
|-----------|-------------------|--------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1 | AAVss-RK-hGUCY2D- | AAV2 5' ITR: 1-141 bp RK: 169-620 | CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTG AGGCCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCG ACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGA GCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCAC |

| SEQ ID NO | Название | Описание | Последовательность |
|-----------|------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | WPRE(mut6) | bp Козак: 813-818 т.п.н. hGUCY2D [cds из NM_000180.4]: 819-4130 т.п.н. WPREmut6: 4131-4719 bp BGH pA: 4774-4981 bp AAV2 3' ITR: 4989-5129 bp | TAGGGGTTCTTCTAGACAACCTTGTATAGAAA AGTTGTGTAGTTAATGATTAACCCGCCATGCTA CTTATCTACGTACATTTATATTGGCTCATGTCCA ACATTACCGCCATGTTGACATTGATTATTGACT AGAATTTCGCTAGCAAGATCCAAGCTCAGATCTC GATCGAGTTGGGCCCCAGAAGCCTGGTGGTTGT TTGTCCTTCTCAGGGGAAAAGTGAGGCGGCCCC TTGGAGGAAGGGGCCGGGCAGAATGATCTAAT CGGATTCCAAGCAGCTCAGGGGATTGTCTTTTT CTAGCACCTTCTTGCCACTCCTAAGCGTCCTCC GTGACCCCGGCTGGGATTTAGCCTGGTGTGTG TCAGCCCCGGTCTCCAGGGGCTTCCAGTGGT CCCCAGGAACCCTCGACAGGGCCCGTCTCTCT CGTCCAGCAAGGGCAGGGACGGGCCACAGGCC AAGGGCCCTCGATCGAGGAACTGAAAAACCAG AAAGTTAACTGGTAAGTTTAGTCTTTTTGTCTTT TATTTCAGGTCCCGGATCCGGTGGTGGTGCAA TCAAAGAACTGCTCCTCAGTGGATGTTGCCTTT ACTTCTAGGCCTGTACGGAAGTGTTACTTCTGC TCTAAAAGCTGCGGAATTGTACCCGCGGCCGCC AAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTGCCACCATG ACCGCCTGCGCCCGCCGAGCGGGTGGGCTTCC GGACCCCGGGCTCTGCGGTCCCGCGTGGTGGG CTCCGTCCCTGCCCGCCTCCCCGGGCCCTGC CCCGGCTCCCGCTCCTGCTGCTCCTGCTTCTGCT GCAGCCCCCGCCCTCTCCGCCGTGTTACGGT GGGGGTCTGGGCCCTGGGCTTGCGACCCCAT CTTCTCTCGGGCTCGCCCGGACCTGGCCGCCCG CCTGGCCGCCCGCCGCCTGAACCGCGACCCCG GCCTGGCAGGCGGTCCCCGCTTCGAGGTAGCG CTGCTGCCCGAGCCTTGCCGGACGCCGGGCTCG CTGGGGGCCGTGTCCTCCGCGCTGGCCCGCGTG |

| SEQ ID NO | Название | Описание | Последовательность |
|--------------|----------|----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | | | TCGGGCCTCGTGGGTCCGGTGAACCCTGCGGCC TGCCGGCCAGCCGAGCTGCTCGCCGAAGAAGC CGGGATCGCGCTGGTGCCCTGGGGCTGCCCTG GACGCAGGCGGAGGGCACCACGGCCCCTGCCG TGACCCCGCCGCGGATGCCCTCTACGCCCTGC TTCGCGCATTCGGCTGGGCGCGCGTGGCCCTGG TCACCGCCCCCAGGACCTGTGGGTGGAGGCG GGACGCTCACTGTCCACGGCACTCAGGGCCCCG GGGCCTGCCTGTCGCCTCCGTGACTTCCATGGA GCCCTTGGACCTGTCTGGAGCCCAGGAGGCCCT GAGGAAGGTTTCGGGACGGGCCAGGGTCACAG CAGTGATCATGGTGATGCACTCGGTGCTGCTGG GTGGCGAGGAGCAGCGCTACCTCCTGGAGGCC GCAGAGGAGCTGGGCCTGACCGATGGCTCCCT GGTCTTCCTGCCCTTCGACACGATCCACTACGC CTTGTCACCAGGCCCGGAGGCCTTGGCCGCACT CGCCAACAGCTCCAGCTTCGCAGGGCCCACG ATGCCGTGCTCACCCTCACGCGCCACTGTCCCT CTGAAGGCAGCGTGCTGGACAGCCTGCGCAGG GCTCAAGAGCGCCGCGAGCTGCCCTCTGACCTC AATCTGCAGCAGGTCTCCCCACTCTTTGGCACC ATCTATGACGCGGTCTTCTTGCTGGCAAGGGGC GTGGCAGAAGCGCGGGCTGCCGCAGGTGGCAG ATGGGTGTCCGGAGCAGCTGTGGCCCCGCCACA TCCGGGATGCGCAGGTCCCTGGCTTCTGCGGGG ACCTAGGAGGAGACGAGGAGCCCCATTCGTG CTGCTAGACACGGACGCGGGCGGGAGACCGGCT TTTTGCCACATACATGCTGGATCCTGCCCGGGG CTCCTTCCTCTCCGCCGGTACCCGGATGCACTT CCCGCGTGGGGGATCAGCACCCGGACCTGACC CCTCGTGCTGGTTCGATCCAAACAACATCTGCG GTGGAGGACTGGAGCCGGGCCTCGTCTTCTTG |

| SEQ ID NO | Название | Описание | Последовательность |
|--------------|----------|----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | | | GCTTCCTCCTGGTGGTTGGGATGGGGCTGGCTG GGGCCTTCCTGGCCATTATGTGAGGCACCGGC TACTTCACATGCAAATGGTCTCCGGCCCCAACA AGATCATCCTGACCGTGGACGACATCACCTTTC TCCACCCACATGGGGGCACCTCTCGAAAGGTG GCCCAGGGGAGTCGATCAAGTCTGGGTGCCCG CAGCATGTCAGACATTCGCAGCGGCCCCAGCC AACACTTGGACAGCCCCAACATTGGTGTCTATG AGGGAGACAGGGTTTGGCTGAAGAAATTCCCA GGGGATCAGCACATAGCTATCCGCCCAGCAAC CAAGACGGCCTTCTCCAAGCTCCAGGAGCTCCG GCATGAGAACGTGGCCCTCTACCTGGGGCTTTT CCTGGCTCGGGGAGCAGAAGGCCCTGCGGCC TCTGGGAGGGCAACCTGGCTGTGGTCTCAGAG CACTGCACGCGGGGCTCTCTCAGGACCTCCTC GCTCAGAGAGAAATAAAGCTGGACTGGATGTT CAAGTCCTCCCTCCTGCTGGACCTTATCAAGGG AATAAGGTATCTGCACCATCGAGGCGTGGCTC ATGGGCGGCTGAAGTCACGGAAGTGCATAGTG GATGGCAGATTCGTAAGTCAAGTCACTGACCAC GGCCACGGGAGACTGCTGGAAGCACAGAAGGT GCTACCGGAGCCTCCAGAGCGGAGGACCAGC TGTGGACAGCCCCGGAGCTGCTTAGGGACCCA GCCCTGGAGCGCCGGGGAACGCTGGCCGGCGA CGTCTTTAGCTTGGCCATCATCATGCAAGAAGT AGTGTGCCGCAGTGCCCCTTATGCCATGCTGGA GCTCACTCCCAGGAAGTGGTGCAGAGGGTGC GGAGCCCCCTCCACTGTGTCGGCCCTTGGTGT CCATGGACCAGGCACCTGTCGAGTGTATCCTCC TGATGAAGCAGTGCTGGGCAGAGCAGCCGAA CTTCGGCCCTCCATGGACCACACCTTCGACCTG TTCAAGAACATCAACAAGGGCCGGAAGACGAA |

| SEQ ID NO | Название | Описание | Последовательность |
|--------------|----------|----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | | | CATCATTTGACTCGATGCTTCGGATGCTGGAGCA GTA CTCTAGTAACCTGGAGGATCTGATCCGGGA GCGCACGGAGGAGCTGGAGCTGGAAAAGCAGA AGACAGACCGGCTGCTTACACAGATGCTGCCTC CGTCTGTGGCTGAGGCCTTGAAGACGGGGACA CCAGTGGAGCCCGAGTACTTTGAGCAAGTGAC ACTGTACTTTAGTGACATTGTGGGCTTCACCAC CATCTCTGCCATGAGTGAGCCATTGAGGTTGT GGACCTGCTCAACGATCTCTACACACTCTTTGA TGCCATCATTGGTTCCACGATGTCTACAAGGT GGAGACAATAGGGGACGCCTATATGGTGGCCT CGGGGCTGCCCCAGCGGAATGGGCAGCGACAC GCGGCAGAGATCGCCAACATGTCACTGGACAT CCTCAGTGCCGTGGGCACTTTCCGCATGCGCCA TATGCCTGAGGTTCCCGTGCGCATCCGCATAGG CCTGCACTCGGGTCCATGCGTGGCAGGCGTGGT GGGCCTCACCATGCCGCGGTACTGCCTGTTTGG GGACACGGTCAACACCGCCTCGCGCATGGAGT CCACCGGGCTGCCTTACCGCATCCACGTGAACT TGAGCACTGTGGGGATTCTCCGTGCTCTGGACT CGGGCTACCAGGTGGAGCTGCGAGGCCGCACG GAGCTGAAGGGCAAGGGCGCCGAGGACACTTT CTGGCTAGTGGGCAGACGCGGCTTCAACAAGC CCATCCCCAAACCGCCTGACCTGCAACCGGGGT CCAGCAACCACGGCATCAGCCTGCAGGAGATC CCACCCGAGCGGCGACGGAAGCTGGAGAAGGC GCGGCCGGGCCAGTTCTCTTGAATCAACCTCT GGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTAT TCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGA TACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTG CTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTA TAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTT |

| SEQ ID NO | Название | Описание | Последовательность |
|-----------|-------------------------|-----------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | | | <p>GTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTG CACTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGTTG GGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGG GACTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGC GGAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCCTGCTG GACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATT CCGTGGTGTGTCGGGGAAATCATCGTCCTTTC CTTGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTC TGCGCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGG CCCTCAATCCAGCGGACCTTCCTTCCCGCGGCC TGCTGCCGGCTCTGCGGCCTTTCGCGTCTTC GCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTT GGGCCGCCTCCCCGCACCCAGCTTTCTTGTACA AAGTGGGAATTCTAGAGCTCGCTGATCAGCCT CGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTG TTTGCCCCTCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGA AGGTGCCACTCCCCTGTCTTTCTAATAAAA TGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTG TCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGG ACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGAGAATAG CAGGCATGCTGGGGAGGGCCGCAGGAACCCCT AGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGC TCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGG TCGCCCAGCGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCT CAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAG G</p> |
| 2 | AAVss- RK- GUCY2D | AAV2 5' ITR: 1-141 bp RK: 169-620 bp Козак: 813- | <p>CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTG AGGCCGCCCGGGCAAAGCCCAGGGCGTCGGGCG ACCTTTGGTCGCCCAGGCTCAGTGAGCGAGCGA GCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCAC TAGGGGTTCTTCTAGACAACTTTGTATAGAAA AGTTGTGTAGTTAATGATTAACCCGCCATGCTA</p> |

| SEQ ID NO | Название | Описание | Последовательность |
|--------------|----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | | <p>818 т.п.н. hGUCY2D [cds из NM_000180. 4]: 819-4130 т.п.н. BGH рА: 4185-4392 bp AAV2 3' ITR: 4400- 4540 bp</p> | <p>CTTATCTACGTACATTTATATTGGCTCATGTCCA ACATTACCGCCATGTTGACATTGATTATTGACT AGAATTCGCTAGCAAGATCCAAGCTCAGATCTC GATCGAGTTGGGCCCCAGAAGCCTGGTGGTTGT TTGTCCTTCTCAGGGGAAAAGTGAGGGCGGCCCC TTGGAGGAAGGGGCGGGCAGAATGATCTAAT CGGATTCCAAGCAGCTCAGGGGATTGTCTTTTT CTAGCACCTTCTTGCCACTCCTAAGCGTCCTCC GTGACCCCGGCTGGGATTTAGCCTGGTGCTGTG TCAGCCCCGGTCTCCCAGGGGCTTCCCAGTGGT CCCCAGGAACCCTCGACAGGGCCCGGTCTCTCT CGTCCAGCAAGGGCAGGGACGGGCCACAGGCC AAGGGCCCTCGATCGAGGAAGTGA AAAACCAG AAAGTTAACTGGTAAGTTTAGTCTTTTTGTCTTT TATTTCAGGTCCCGGATCCGGTGGTGGTGCAAA TCAAAGAACTGCTCCTCAGTGGATGTTGCCTTT ACTTCTAGGCCTGTACGGAAGTGTTACTTCTGC TCTAAAAGCTGCGGAATTGTACCCGCGGCCGCC AAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTGCCACCATG ACCGCCTGCGCCCGCCGAGCGGGTGGGCTTCC GGACCCCGGGCTCTGCGGTCCCGCGTGGTGGG CTCCGTCCCTGCCCCGCTCCCCGGGCCCTGC CCCGGCTCCCGCTCCTGCTGCTCCTGCTTCTGCT GCAGCCCCCGCCCTCTCCGCCGTGTTACGGT GGGGGTCTGGGCCCTGGGCTTGCGACCCCAT CTTCTCTCGGGCTCGCCCGGACCTGGCCGCCCG CCTGGCCGCCGCCGCTGAACCGCGACCCCG GCCTGGCAGGCGGTCCCCGCTTCGAGGTAGCG CTGCTGCCCAGCCTTGCCGGACGCCGGGCTCG CTGGGGGCCGTGTCCTCCGCGCTGGCCCGCGTG TCGGGCCTCGTGGGTCCGGTGAACCCTGCGGCC TGCCGGCCAGCCGAGCTGCTCGCCGAAGAAGC</p> |

| SEQ ID NO | Название | Описание | Последовательность |
|--------------|----------|----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | | | CGGGATCGCGCTGGTGCCCTGGGGCTGCCCCTG GACGCAGGCGGAGGGCACCACGGCCCCCTGCCG TGACCCCCGCCGCGGATGCCCTCTACGCCCTGC TTCGCGCATTCGGCTGGGCGCGCGTGGCCCTGG TCACCGCCCCCAGGACCTGTGGGTGGAGGCG GGACGCTCACTGTCCACGGCACTCAGGGCCCG GGCCTGCCTGTCGCCTCCGTGACTTCCATGGA GCCCTTGGACCTGTCTGGAGCCCGGGAGGCCCT GAGGAAGGTTTCGGGACGGGCCAGGGTCACAG CAGTGATCATGGTGATGCACTCGGTGCTGCTGG GTGGCGAGGAGCAGCGCTACCTCCTGGAGGCC GCAGAGGAGCTGGGCCTGACCGATGGCTCCCT GGTCTTCCTGCCCTTCGACACGATCCACTACGC CTTGTCCCCAGGCCCGGAGGCCTTGGCCGCACT CGCCAACAGCTCCCAGCTTCGCAGGGCCACG ATGCCGTGCTCACCTCACGCGCCACTGTCCCT CTGAAGGCAGCGTGCTGGACAGCCTGCGCAGG GCTCAAGAGCGCCGCGAGCTGCCCTCTGACCTC AATCTGCAGCAGGTCTCCCCACTCTTTGGCACC ATCTATGACGCGGTCTTCTTGCTGGCAAGGGGC GTGGCAGAAGCGCGGGCTGCCGCAGGTGGCAG ATGGGTGTCCGGAGCAGCTGTGGCCCGCCACA TCCGGGATGCGCAGGTCCCTGGCTTCTGCGGGG ACCTAGGAGGAGACGAGGAGCCCCATTCGTG CTGCTAGACACGGACGCGGCGGGAGACCGGCT TTTTGCCACATACATGCTGGATCCTGCCCGGGG CTCCTTCCTCTCCGCCGGTACCCGGATGCACTT CCCGCGTGGGGGATCAGCACCCGGACCTGACC CCTCGTGCTGGTTCGATCCAAACAACATCTGCG GTGGAGGACTGGAGCCGGGCCTCGTCTTTCTTG GCTTCCTCCTGGTGGTTGGGATGGGGCTGGCTG GGCCTTCCTGGCCCATATGTGAGGCACCGGC |

| SEQ ID NO | Название | Описание | Последовательность |
|--------------|----------|----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | | | <p>TACTTCACATGCAAATGGTCTCCGGCCCCAACA AGATCATCCTGACCGTGGACGACATCACCTTTC TCCACCCACATGGGGGCACCTCTCGAAAGGTG GCCCAGGGGAGTCGATCAAGTCTGGGTGCCCG CAGCATGTCAGACATTCGCAGCGGCCCCAGCC AACACTTGGACAGCCCCAACATTGGTGTCTATG AGGGAGACAGGGTTTGGCTGAAGAAATTCCCA GGGGATCAGCACATAGCTATCCGCCCAGCAAC CAAGACGGCCTTCTCCAAGCTCCAGGAGCTCCG GCATGAGAACGTGGCCCTCTACCTGGGGCTTTT CCTGGCTCGGGGAGCAGAAGGCCCTGCGGCC TCTGGGAGGGCAACCTGGCTGTGGTCTCAGAG CACTGCACGCGGGGCTCTCTTCAGGACCTCCTC GCTCAGAGAGAAATAAAGCTGGACTGGATGTT CAAGTCCTCCCTCCTGCTGGACCTTATCAAGGG AATAAGGTATCTGCACCATCGAGGCGTGGCTC ATGGGCGGCTGAAGTCACGGAAGTGCATAGTG GATGGCAGATTCGTA CTCAAGATCACTGACCAC GGCCACGGGAGACTGCTGGAAGCACAGAAGGT GCTACCGGAGCCTCCCAGAGCGGAGGACCAGC TGTGGACAGCCCCGGAGCTGCTTAGGGACCCA GCCCTGGAGCGCCGGGGAACGCTGGCCGGCGA CGTCTTTAGCTTGGCCATCATCATGCAAGAAGT AGTGTGCCG CAGTGCCCCTTATGCCATGCTGGA GCTCACTCCCGAGGAAGTGGTGCAGAGGGTGC GGAGCCCCCTCCACTGTGTCGGCCCTTGGTGT CCATGGACCAGGCACCTGTGCGAGTGTATCCTCC TGATGAAGCAGTGCTGGGCAGAGCAGCCGAA CTTCGGCCCTCCATGGACCACACCTTCGACCTG TTCAAGAACATCAACAAGGGCCGGAAGACGAA CATCATTGACTCGATGCTTCGGATGCTGGAGCA GTA CTCTAGTAACTGGAGGATCTGATCCGGGA</p> |

| SEQ ID NO | Название | Описание | Последовательность |
|--------------|----------|----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | | | GCGCACGGAGGAGCTGGAGCTGGAAAAGCAGA AGACAGACCGGCTGCTTACACAGATGCTGCCTC CGTCTGTGGCTGAGGCCTTGAAGACGGGGACA CCAGTGGAGCCCGAGTACTTTGAGCAAGTGAC ACTGTACTIONTAGTGACATTGTGGGCTTCACCAC CATCTCTGCCATGAGTGAGCCATTGAGGTTGT GGACCTGCTCAACGATCTCTACACACTCTTTGA TGCCATCATTGGTTCCCACGATGTCTACAAGGT GGAGACAATAGGGGACGCCTATATGGTGGCCT CGGGGCTGCCCCAGCGGAATGGGCAGCGACAC GCGGCAGAGATCGCCAACATGTCACTGGACAT CCTCAGTGCCGTGGGCACCTTCCGCATGCGCCA TATGCCTGAGGTTCCCGTGCGCATCCGCATAGG CCTGCACTCGGGTCCATGCGTGGCAGGCGTGGT GGGCCTCACCATGCCGCGGTACTGCCTGTTTGG GGACACGGTCAACACCGCCTCGCGCATGGAGT CCACCGGGCTGCCTTACCGCATCCACGTGAACT TGAGCACTGTGGGGATTCTCCGTGCTCTGGACT CGGGCTACCAGGTGGAGCTGCGAGGCCGCACG GAGCTGAAGGGCAAGGGCGCCGAGGACACTTT CTGGCTAGTGGGCAGACGCGGCTTCAACAAGC CCATCCCCAAACCGCCTGACCTGCAACCGGGGT CCAGCAACCACGGCATCAGCCTGCAGGAGATC CCACCCGAGCGGCGACGGAAGCTGGAGAAGGC GCGGCCGGGCCAGTTCTCTTGAACCCAGCTTTC TTGTACAAAGTGGGAATTCCTAGAGCTCGCTGA TCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCA TCTGTTGTTTGCCCCCTCCCCGTGCCTTCCTTGA CCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTTCT AATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTG AGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTG GGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAG |

| SEQ ID NO | Название | Описание | Последовательность |
|-----------|--------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | | | AGAATAGCAGGCATGCTGGGGAGGGCCGCAGG AACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTC TGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGGCGAC CAAAGGTCGCCCACGCCCCGGGCTTTGCCCGG GCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTG CCTGCAGG |
| 3 | AAVss- CMV- hGUCY2 D- WPRE(m ut6) | AAV2 5' ITR: 1-141 bp CMV: 169- 757 bp Козак: 782- 787 т.п.н. hGUCY2D [cds из NM_000180. 4]: 788-4099 т.п.н. WPRE(mut6): 4100-4688 bp BGH pA: 4743-4950 bp AAV2 3' ITR: 4958- 5098 bp | CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTG AGGCCGCCCCGGGCAAAGCCCCGGGCGTCGGGCG ACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGA GCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCAC TAGGGGTTCTTCTAGACAACCTTTGTATAGAAA AGTTGTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGG TCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCG GTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCCGCTGGC TGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCA ATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATA GGGACTTTCATTGACGTCAATGGGTGGAGTAT TTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAA GTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGAC GTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTAT GCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACT TGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATT ACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAAT GGGCGTGGATAGCGGTTTGGACTCACGGGGATT CCAAGTCTCCACCCCATGACGTCAATGGGAGT TTGTTTTGGCACCAAATCAACGGGACTTTCCA AAATGTCGTAACAACCTCCGCCCATGACGCAA ATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTA TATAAGCAGAGCTGGTTTAGTGAACCGTCAGAT CCAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTGCCACCA TGACCGCCTGCGCCCCGCCGAGCGGGTGGGCTTC CGGACCCCCGGGCTCTGCGGTCCCGCGTGGTGG |

| SEQ ID NO | Название | Описание | Последовательность |
|--------------|----------|----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | | | GCTCCGTCCCTGCCCCGCCTCCCCGGGCCCTG CCCCGGCTCCCGCTCCTGCTGCTCCTGCTTCTGC TGCAGCCCCCGCCCTCTCCGCCGTGTTACGG TGGGGTCTCTGGGCCCTGGGCTTGCACCCCA TCTTCTCTCGGGCTCGCCCGGACCTGGCCGCC GCCTGGCCGCCGCCCGCCTGAACCGCGACCCC GGCCTGGCAGGCGGTCCCCGCTTCGAGGTAGC GCTGCTGCCCCGAGCCTTGCCGGACGCCGGGCTC GCTGGGGGCGCGTGTCTCCGCGCTGGCCCGCGT GTCGGGCCTCGTGGGTCCGGTGAACCCTGCGGC CTGCCGGCCAGCCGAGCTGCTCGCCGAAGAAG CCGGGATCGCGCTGGTGCCCTGGGGCTGCCCT GGACGCAGGCGGAGGGCACACGGCCCCTGCC GTGACCCCCGCCGCGGATGCCCTCTACGCCCTG CTTCGCGCATTCGGCTGGGCGCGCGTGGCCCTG GTCACCGCCCCCAGGACCTGTGGGTGGAGGC GGGACGCTCACTGTCCACGGCACTCAGGGCCC GGGGCCTGCCTGTCGCCTCCGTGACTTCCATGG AGCCCTTGACCTGTCTGGAGCCCGGGAGGCC CTGAGGAAGGTTTCGGGACGGGCCAGGGTAC AGCAGTGATCATGGTGATGCACTCGGTGCTGCT GGGTGGCGAGGAGCAGCGCTACCTCCTGGAGG CCGCAGAGGAGCTGGGCCTGACCGATGGCTCC CTGGTCTTCTGCCCTTCGACACGATCCACTAC GCCTTGTCCCCAGGCCCGGAGGCCTTGGCCGCA CTCGCCAACAGCTCCCAGCTTCGCAGGGCCCAC GATGCCGTGCTCACCTCACGCGCCACTGTCCC TCTGAAGGCAGCGTGCTGGACAGCCTGCGCAG GGCTCAAGAGCGCCGCGAGCTGCCCTCTGACCT CAATCTGCAGCAGGTCTCCCCACTCTTTGGCAC CATCTATGACGCGGTCTTCTTGCTGGCAAGGGG CGTGGCAGAAGCGCGGGCTGCCGCAGGTGGCA |

| SEQ ID NO | Название | Описание | Последовательность |
|--------------|----------|----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | | | GATGGGTGTCCGGAGCAGCTGTGGCCCCGCCAC ATCCGGGATGCGCAGGTCCCTGGCTTCTGCGGG GACCTAGGAGGAGACGAGGAGCCCCATTCGT GCTGCTAGACACGGACGCGGCGGGAGACCGGC TTTTTGCCACATACATGCTGGATCCTGCCCGGG GCTCCTTCTCTCCGCCGGTACCCGGATGCACT TCCCGCGTGGGGGATCAGCACCCGGACCTGAC CCCTCGTGCTGGTTCGATCCAAACAACATCTGC GGTGGAGGACTGGAGCCGGGCCTCGTCTTTCTT GGCTTCCTCCTGGTGGTTGGGATGGGGCTGGCT GGGGCCTTCTGGCCATTATGTGAGGCACCGG CTACTTCACATGCAAATGGTCTCCGGCCCCAAC AAGATCATCCTGACCGTGGACGACATCACCTTT CTCCACCCACATGGGGGCACCTCTCGAAAGGT GGCCAGGGGAGTCGATCAAGTCTGGGTGCC GCAGCATGTCAGACATTCGCAGCGGCCCCAGC CAACACTTGGACAGCCCCAACATTGGTGTCTAT GAGGGAGACAGGGTTTGGCTGAAGAAATTCCC AGGGGATCAGCACATAGCTATCCGCCAGCAA CCAAGACGGCCTTCTCCAAGCTCCAGGAGCTCC GGCATGAGAACGTGGCCCTTACCTGGGGCTTT TCCTGGCTCGGGGAGCAGAAGGCCCTGCGGCC CTCTGGGAGGGCAACCTGGCTGTGGTCTCAGA GCACTGCACGCGGGGCTCTCTTCAGGACCTCCT CGCTCAGAGAGAAATAAAGCTGGACTGGATGT TCAAGTCCTCCCTCCTGCTGGACCTTATCAAGG GAATAAGGTATCTGCACCATCGAGGCGTGGCT CATGGGCGGCTGAAGTCACGGAAGTGCATAGT GGATGGCAGATTCGTAAGATCACTGACC ACGGCCACGGGAGACTGCTGGAAGCACAGAAG GTGCTACCGGAGCCTCCAGAGCGGAGGACCA GCTGTGGACAGCCCCGGAGCTGCTTAGGGACC |

| SEQ ID NO | Название | Описание | Последовательность |
|--------------|----------|----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | | | CAGCCCTGGAGCGCCGGGGAACGCTGGCCGGC GACGTCTTTAGCTTGGCCATCATCATGCAAGAA GTAGTGTGCCGCAGTGCCCCTTATGCCATGCTG GAGCTCACTCCCGAGGAAGTGGTGCAGAGGGT GCGGAGCCCCCTCCACTGTGTCGGCCCTTGGT GTCCATGGACCAGGCACCTGTCGAGTGTATCCT CCTGATGAAGCAGTGCTGGGCAGAGCAGCCGG AACTTCGGCCCTCCATGGACCACACCTTCGACC TGTTCAAGAACATCAACAAGGGCCGGAAGACG AACATCATTGACTCGATGCTTCGGATGCTGGAG CAGTACTCTAGTAACCTGGAGGATCTGATCCGG GAGCGCACGGAGGAGCTGGAGCTGGAAAAGCA GAAGACAGACCGGCTGCTTACACAGATGCTGC CTCCGTCTGTGGCTGAGGCCTTGAAGACGGGG ACACCAGTGGAGCCCGAGTACTTTGAGCAAGT GACACTGTACTTTAGTGACATTGTGGGCTTCAC CACCATCTCTGCCATGAGTGAGCCCATTGAGGT TGTGGACCTGCTCAACGATCTCTACACACTCTT TGATGCCATCATTGGTTCCCACGATGTCTACAA GGTGGAGACAATAGGGGACGCCTATATGGTGG CCTCGGGGCTGCCCCAGCGGAATGGGCAGCGA CACGCGGCAGAGATCGCCAACATGTCACTGGA CATCCTCAGTGCCGTGGGCACTTTCCGCATGCG CCATATGCCTGAGGTTCCCGTGCGCATCCGCAT AGGCCTGCACTCGGGTCCATGCGTGGCAGGCG TGGTGGGCCTCACCATGCCGCGGTACTGCCTGT TTGGGGACACGGTCAACACCGCCTCGCGCATG GAGTCCACCGGGCTGCCTTACCGCATCCACGTG AACTTGAGCACTGTGGGGATTCTCCGTGCTCTG GACTCGGGCTACCAGGTGGAGCTGCGAGGCCG CACGGAGCTGAAGGGCAAGGGCGCCGAGGACA CTTCTGGCTAGTGGGCAGACGCGGCTTCAACA |

| SEQ ID NO | Название | Описание | Последовательность |
|--------------|----------|----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | | | AGCCCATCCCCAAACCGCCTGACCTGCAACCG GGGTCCAGCAACCACGGCATCAGCCTGCAGGA GATCCCACCCGAGCGGGACGGAAGCTGGAGA AGGCGCGGCCGGGCCAGTTCTCTTGAAATCAA CCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACT GGTATTCTTAACATATGTTGCTCCTTTTACGCTAT GTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATG CTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTC CTTGATAAAATCCTGGTTGCTGTCTTTATGAG GAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTG GTGTGCACTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCACT GGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTT TCCGGGACTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCA CGGCGGAACATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCT GCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGAC AATTCCGTGGTGTTGTCGGGGAAATCATCGTCC TTTCCTTGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGG ATTCTGCGCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCCT TCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCCTCCCGC GGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGT CTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCC CTTTGGGCGCCTCCCCGCACCCAGCTTTCTTG TACAAAGTGGGAATTCCTAGAGCTCGCTGATCA GCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCT GTTGTTTGCCCTCCCCCGTGCCTTCCCTGACCC TGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTTCCTAAT AAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGT AGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGG CAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGAGA ATAGCAGGCATGCTGGGGAGGGCCGCAGGAAC CCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGC GCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCA |

| SEQ ID NO | Название | Описание | Последовательность |
|-----------|--------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | | | AAGGTCGCCCCGACGCCCCGGGCTTTGCCCGGGC GGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCC TGCAGG |
| 4 | AAV _{ss} - CMV- hGUCY2 D | AAV2 5' ITR: 1-141 bp CMV: 169- 757 bp Козак: 782- 787 т.п.н. hGUCY2D [cds из NM_000180. 4]: 788-4099 т.п.н. BGH рА: 4154-4361 bp AAV2 3' ITR: 4369- 4509 bp | CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTG AGGCCGCCCCGGGCAAAGCCCCGGGCGTCGGGCG ACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGA GCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCAC TAGGGGTTCCTTCTAGACAACCTTTGTATAGAAA AGTTGTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGG TCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGC GTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGC TGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCA ATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATA GGGACTTTCATTGACGTCAATGGGTGGAGTAT TTACGGTAAACTGCCACTTGGCAGTACATCAA GTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGAC GTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTAT GCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACT TGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATT ACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAAT GGGCGTGGATAGCGGTTTTGACTCACGGGGATTT CCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAGT TTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCA AAATGTCGTAACAACCTCCGCCCCATTGACGCAA ATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTA TATAAGCAGAGCTGGTTTAGTGAACCGTCAGAT CCAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGCCACCA TGACCGCCTGCGCCCCGCCGAGCGGGTGGGCTTC CGGACCCCCGGGCTCTGCGGTCCCGCGTGGTGG GCTCCGTCCCTGCCCCGCCTCCCCGGGCCCTG CCCCGGCTCCCGCTCCTGCTGCTCCTGCTTCTGC TGCAGCCCCCGCCCTCTCCGCCGTGTTACGG |

| SEQ ID NO | Название | Описание | Последовательность |
|--------------|----------|----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | | | <p>TGGGGGTCCTGGGCCCCTGGGCTTGCGACCCCA TCTTCTCTCGGGCTCGCCCGGACCTGGCCGCCC GCCTGGCCGCCGCCCGCCTGAACCGCGACCCC GGCCTGGCAGGCGGTCCCCGCTTCGAGGTAGC GCTGCTGCCCCGAGCCTTGCCGGACGCCGGGCTC GCTGGGGGCGCGTGTCTCCGCGCTGGCCCGCGT GTCGGGCCTCGTGGGTCCGGTGAACCCTGCGGC CTGCCGGCCAGCCGAGCTGCTCGCCGAAGAAG CCGGGATCGCGCTGGTGCCCTGGGGCTGCCCT GGACGCAGGCGGAGGGCACCACGGCCCCTGCC GTGACCCCCGCCGCGGATGCCCTCTACGCCCTG CTTCGCGCATTCGGCTGGGCGCGCGTGGCCCTG GTCACCGCCCCCAGGACCTGTGGGTGGAGGC GGGACGCTCACTGTCCACGGCACTCAGGGCCC GGGGCCTGCCTGTCGCCTCCGTGACTTCCATGG AGCCCTTGACCTGTCTGGAGCCCGGGAGGCC CTGAGGAAGGTTCCGGGACGGGCCAGGGTCAC AGCAGTGATCATGGTGATGCACTCGGTGCTGCT GGGTGGCGAGGAGCAGCGCTACCTCCTGGAGG CCGCAGAGGAGCTGGGCCTGACCGATGGCTCC CTGGTCTTCTGCCCTTCGACACGATCCACTAC GCCTTGTCCCCAGGCCCGGAGGCCTTGGCCGCA CTGCCAACAGCTCCCAGCTTCGCAGGGCCCAC GATGCCGTGCTCACCTCACGCGCCACTGTCCC TCTGAAGGCAGCGTGCTGGACAGCCTGCGCAG GGCTCAAGAGCGCCGCGAGCTGCCCTCTGACCT CAATCTGCAGCAGGTCTCCCCACTCTTTGGCAC CATCTATGACGCGGTCTTCTTGCTGGCAAGGGG CGTGGCAGAAGCGCGGGCTGCCGCAGGTGGCA GATGGGTGTCCGGAGCAGCTGTGGCCCCGCCAC ATCCGGGATGCGCAGGTCCCTGGCTTCTGCGGG GACCTAGGAGGAGACGAGGAGCCCCCATTCGT</p> |

| SEQ ID NO | Название | Описание | Последовательность |
|--------------|----------|----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | | | GCTGCTAGACACGGACGCGGCGGGAGACCGGC TTTTTGCCACATACATGCTGGATCCTGCCCGGG GCTCCTTCCTCTCCGCCGGTACCCGGATGCACT TCCCGCGTGGGGGATCAGCACCCGGACCTGAC CCCTCGTGCTGGTTTCGATCCAAACAACATCTGC GGTGGAGGACTGGAGCCGGGCCTCGTCTTTCTT GGCTTCCTCCTGGTGGTTGGGATGGGGCTGGCT GGGGCCTTCCTGGCCCATTATGTGAGGCACCGG CTACTTCACATGCAAATGGTCTCCGGCCCCAAC AAGATCATCCTGACCGTGGACGACATCACCTTT CTCCACCCACATGGGGGCACCTCTCGAAAGGT GGCCCAGGGGAGTCGATCAAGTCTGGGTGCC GCAGCATGTCAGACATTCGCAGCGGCCCCAGC CAACACTTGGACAGCCCCAACATTGGTGTCTAT GAGGGAGACAGGGTTTGGCTGAAGAAATTCCC AGGGGATCAGCACATAGCTATCCGCCAGCAA CCAAGACGGCCTTCTCCAAGCTCCAGGAGCTCC GGCATGAGAACGTGGCCCTCTACCTGGGGCTTT TCCTGGCTCGGGGAGCAGAAGGCCCTGCGGCC CTCTGGGAGGGCAACCTGGCTGTGGTCTCAGA GCACTGCACGCGGGGCTCTCTTCAGGACCTCCT CGCTCAGAGAGAAATAAAGCTGGACTGGATGT TCAAGTCCTCCCTCCTGCTGGACCTTATCAAGG GAATAAGGTATCTGCACCATCGAGGCGTGGCT CATGGGCGGCTGAAGTCACGGAAGTGCATAGT GGATGGCAGATTTCGTAAGTCAAGATCACTGACC ACGGCCACGGGAGACTGCTGGAAGCACAGAAG GTGCTACCGGAGCCTCCCAGAGCGGAGGACCA GCTGTGGACAGCCCCGGAGCTGCTTAGGGACC CAGCCCTGGAGCGCCGGGGAACGCTGGCCGGC GACGTCTTTAGCTTGGCCATCATCATGCAAGAA GTAGTGTGCCGCAGTGCCCCTTATGCCATGCTG |

| SEQ ID NO | Название | Описание | Последовательность |
|--------------|----------|----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | | | <p>GAGCTCACTCCCGAGGAAGTGGTGCAGAGGGT GCGGAGCCCCCTCCACTGTGTCGGCCCTTGGT GTCCATGGACCAGGCACCTGTCGAGTGTATCCT CCTGATGAAGCAGTGCTGGGCAGAGCAGCCGG AACTTCGGCCCTCCATGGACCACACCTTCGACC TGTTCAAGAACATCAACAAGGGCCGGAAGACG AACATCATTGACTCGATGCTTCGGATGCTGGAG CAGTACTCTAGTAACCTGGAGGATCTGATCCGG GAGCGCACGGAGGAGCTGGAGCTGGAAAAGCA GAAGACAGACCGGCTGCTTACACAGATGCTGC CTCCGTCTGTGGCTGAGGCCTTGAAGACGGGG ACACCAGTGGAGCCCGAGTACTTTGAGCAAGT GACACTGTACTTTAGTGACATTGTGGGCTTCAC CACCATCTCTGCCATGAGTGAGCCCATTGAGGT TGTGGACCTGCTCAACGATCTCTACACACTCTT TGATGCCATCATTGGTTCCCACGATGTCTACAA GGTGGAGACAATAGGGGACGCCTATATGGTGG CCTCGGGGCTGCCCCAGCGGAATGGGCAGCGA CACGCGGCAGAGATCGCCAACATGTCACTGGA CATCCTCAGTGCCGTGGGCACTTTCCGCATGCG CCATATGCCTGAGGTTCCCGTGCGCATCCGCAT AGGCCTGCACTCGGGTCCATGCGTGGCAGGCG TGGTGGGCCTCACCATGCCGCGGTA CTGCCTGT TTGGGGACACGGTCAACACCGCCTCGCGCATG GAGTCCACCGGGCTGCCTTACCGCATCCACGTG AACTTGAGCACTGTGGGGATTCTCCGTGCTCTG GACTCGGGCTACCAGGTGGAGCTGCGAGGCCG CACGGAGCTGAAGGGCAAGGGCGCCGAGGACA CTTTCTGGCTAGTGGGCAGACGCGGCTTCAACA AGCCCATCCCCAAACCGCCTGACCTGCAACCG GGGTCCAGCAACCACGGCATCAGCCTGCAGGA GATCCCACCCGAGCGGCGACGGAAGCTGGAGA</p> |

| SEQ ID NO | Название | Описание | Последовательность |
|-----------|----------------|----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | | | AGGCGCGGCCGGGCCAGTTCTCTTGAACCCAG CTTTCTTGTACAAAGTGGGAATTCCTAGAGCTC GCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCC AGCCATCTGTTGTTTGCCCTCCCCGTGCCTTC CTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCT TTCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTG TCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGG GGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGG GAAGAGAATAGCAGGCATGCTGGGGAGGGCCG CAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCC TCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGG CGACCAAAGGTCGCCCCGACGCCCGGGCTTTGC CCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCA GCTGCCTGCAGG |
| 5 | AAV2 5' ITR | 141 bp | CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTG AGGCCGCCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCG ACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGA GCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCAC TAGGGGTTTCCT |
| 6 | AAV2 3' ITR | 141 bp | AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCT CTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGC GACCAAAGGTCGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCC CGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAG CTGCCTGCAGG |
| 7 | Промотор RK | | TGTAGTTAATGATTAACCCGCCATGCTACTTAT CTACGTACATTTATATTGGCTCATGTCCAACAT TACCGCCATGTTGACATTGATTATTGACTAGAA TTCGCTAGCAAGATCCAAGCTCAGATCTCGATC GAGTTGGGCCCCAGAAGCCTGGTGGTTGTTTGT CCTTCTCAGGGGAAAAGTGAGGCGGCCCTTG GAGGAAGGGGCCGGGCAGAATGATCTAATCGG ATTCCAAGCAGCTCAGGGGATTGTCTTTTTCTA |

| SEQ ID NO | Название | Описание | Последовательность |
|-----------|-----------------------------------------|----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | | | GCACCTTCTTGCCACTCCTAAGCGTCCTCCGTG ACCCCGGCTGGGATTTAGCCTGGTGTGTGTCA GCCCCGGTCTCCCAGGGGCTTCCCAGTGGTCCC CAGGAACCCTCGACAGGGCCCGGTCTCTCTCGT CCAGCAAGGGCAGGGACGGGCCACAGGCCAAG GGCCCTCGATCGAGGAACTGAAAAAC |
| 8 | Промотор CMV | | TAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATT AGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTAC ATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACC GCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAAT GACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGA CTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTAC GGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGT ATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCA ATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCC AGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGC AGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCA TGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGC GTGGATAGCGGTTTACTCACGGGGATTTCCAA GTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGT TTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAT GTCGTAACAACCTCCGCCCCATTGACGCAAATGG GCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATA AGCAGAGCTGGTTTAGTGAACCGTCAGATC |
| 9 | hGUCY2 D [cds из NM_0001 80.4] | | ATGACCGCCTGCGCCCGCCGAGCGGGTGGGCT TCCGGACCCCGGGCTCTGCGGTCCCGCGTGGTG GGCTCCGTCCCTGCCCGCCTCCCCGGGCCCT GCCCCGGTCCCCTGCTCCTGCTGCTCCTGCTTCT GCTGCAGCCCCCGCCCTCTCCGCCGTGTTAC GGTGGGGTCTGGGCCCTGGGCTTGCACCC CATCTTCTCGGGCTCGCCCGGACCTGGCCGC CCGCCTGGCCGCCCGCCCGCCTGAACCGCGACCC |

| SEQ ID NO | Название | Описание | Последовательность |
|--------------|----------|----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | | | CGGCCTGGCAGGCGGTCCCCGCTTCGAGGTAG CGCTGCTGCCCGAGCCTTGCCGGACGCCGGGCT CGCTGGGGGCCGTGTCCTCCGCGCTGGCCCCGCG TGTCGGGCCTCGTGGGTCCGGTGAACCCTGCGG CCTGCCGGCCAGCCGAGCTGCTCGCCGAAGAA GCCGGGATCGCGCTGGTGCCCTGGGGCTGCCCC TGGACGCAGGCGGAGGGCACACGGCCCCCTGC CGTGACCCCCGCCGCGGATGCCCTCTACGCCCT GCTTCGCGCATTCGGCTGGGCGCGCGTGGCCCT GGTCACCGCCCCCAGGACCTGTGGGTGGAGG CGGGACGCTCACTGTCCACGGCACTCAGGGCC CGGGGCCTGCCTGTCGCCTCCGTGACTTCCATG GAGCCCTTGGACCTGTCTGGAGCCCGGGAGGC CCTGAGGAAGGTTCCGGGACGGGCCCAGGGTCA CAGCAGTGATCATGGTGATGCACTCGGTGCTGC TGGGTGGCGAGGAGCAGCGCTACCTCCTGGAG GCCGCAGAGGAGCTGGGCCTGACCGATGGCTC CCTGGTCTTCCTGCCCTTCGACACGATCCACTA CGCCTTGTCCCCAGGCCCGGAGGCCTTGGCCGC ACTCGCCAACAGCTCCCAGCTTCGCAGGGCCCA CGATGCCGTGCTCACCTCACGCGCCACTGTCC CTCTGAAGGCAGCGTGCTGGACAGCCTGCGCA GGGCTCAAGAGCGCCGCGAGCTGCCCTCTGAC CTCAATCTGCAGCAGGTCTCCCCACTCTTTGGC ACCATCTATGACGCGGTCTTCTTGCTGGCAAGG GGCGTGGCAGAAGCGCGGGCTGCCGCAGGTGG CAGATGGGTGTCCGGAGCAGCTGTGGCCCCGCC ACATCCGGGATGCGCAGGTCCCTGGCTTCTGCG GGGACCTAGGAGGAGACGAGGAGCCCCCATTC GTGCTGCTAGACACGGACGCGGGCGGGAGACCG GCTTTTTGCCACATACATGCTGGATCCTGCCCG GGGCTCCTTCCTCTCCGCCGGTACCCGGATGCA |

| SEQ ID NO | Название | Описание | Последовательность |
|--------------|----------|----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | | | CTTCCCGCGTGGGGGATCAGCACCCGGACCTG ACCCCTCGTGCTGGTTCGATCCAAACAACATCT GCGGTGGAGGACTGGAGCCGGGCTCGTCTTTC TTGGCTTCTCCTGGTGGTTGGGATGGGGCTGG CTGGGGCCTTCCTGGCCCATTATGTGAGGCACC GGCTACTTCACATGCAAATGGTCTCCGGCCCCA ACAAGATCATCCTGACCGTGGACGACATCACCT TTCTCCACCCACATGGGGGCACCTCTCGAAAGG TGGCCCAGGGGAGTCGATCAAGTCTGGGTGCC CGCAGCATGTCAGACATTCGCAGCGGCCCCAG CCAACACTTGGACAGCCCCAACATTGGTGTCTA TGAGGGAGACAGGGTTTGGCTGAAGAAATTCC CAGGGGATCAGCACATAGCTATCCGCCAGCA ACCAAGACGGCCTTCTCCAAGCTCCAGGAGCTC CGGCATGAGAACGTGGCCCTCTACCTGGGGCTT TTCCTGGCTCGGGGAGCAGAAGGCCCTGCGGC CCTCTGGGAGGGCAACCTGGCTGTGGTCTCAGA GCACTGCACGCGGGGCTCTCTTCAGGACCTCCT CGCTCAGAGAGAAATAAAGCTGGACTGGATGT TCAAGTCCTCCCTCCTGCTGGACCTTATCAAGG GAATAAGGTATCTGCACCATCGAGGCGTGGCT CATGGGCGGCTGAAGTCACGGAAGTGCATAGT GGATGGCAGATTTCGTAAGTCAAGATCACTGACC ACGGCCACGGGAGACTGCTGGAAGCACAGAAG GTGCTACCGGAGCCTCCCAGAGCGGAGGACCA GCTGTGGACAGCCCCGGAGCTGCTTAGGGACC CAGCCCTGGAGCGCCGGGGAACGCTGGCCGGC GACGTCTTTAGCTTGGCCATCATCATGCAAGAA GTAGTGTGCCGCAGTGCCCCTTATGCCATGCTG GAGCTCACTCCCGAGGAAGTGGTGCAGAGGGT GCGGAGCCCCCTCCACTGTGTCGGCCCTTGGT GTCCATGGACCAGGCACCTGTCGAGTGTATCCT |

| SEQ ID NO | Название | Описание | Последовательность |
|--------------|----------------|----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | | | CCTGATGAAGCAGTGCTGGGCAGAGCAGCCGG AACTTCGGCCCTCCATGGACCACACCTTCGACC TGTTCAAGAACATCAACAAGGGCCGGAAGACG AACATCATTGACTCGATGCTTCGGATGCTGGAG CAGTACTCTAGTAACCTGGAGGATCTGATCCGG GAGCGCACGGAGGAGCTGGAGCTGGAAAAGCA GAAGACAGACCGGCTGCTTACACAGATGCTGC CTCCGTCTGTGGCTGAGGCCTTGAAGACGGGG ACACCAGTGGAGCCCGAGTACTTTGAGCAAGT GACACTGTACTTTAGTGACATTGTGGGCTTCAC CACCATCTCTGCCATGAGTGAGCCCATTGAGGT TGTGGACCTGCTCAACGATCTCTACACACTCTT TGATGCCATCATTGGTTCCACGATGTCTACAA GGTGGAGACAATAGGGGACGCCTATATGGTGG CCTCGGGGCTGCCCCAGCGGAATGGGCAGCGA CACGCGGCAGAGATCGCCAACATGTCACTGGA CATCCTCAGTGCCGTGGGCACTTTCCGCATGCG CCATATGCCTGAGGTTCCCGTGCGCATCCGCAT AGGCCTGCACTCGGGTCCATGCGTGGCAGGCG TGGTGGGCCTCACCATGCCGCGGTA CTGCCTGT TTGGGGACACGGTCAACACCGCCTCGCGCATG GAGTCCACCGGGCTGCCTTACCGCATCCACGTG AACTTGAGCACTGTGGGGATTCTCCGTGCTCTG GACTCGGGCTACCAGGTGGAGCTGCGAGGCCG CACGGAGCTGAAGGGCAAGGGCGCCGAGGACA CTTTCTGGCTAGTGGGCAGACGCGGCTTCAACA AGCCCATCCCCAAACCGCCTGACCTGCAACCG GGGTCCAGCAACCACGGCATCAGCCTGCAGGA GATCCCACCCGAGCGGCGACGGAAGCTGGAGA AGGCGCGGCCGGGCCAGTTCTCTTGA |
| 10 | WPRE (mut6) | | AATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGA TTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTA |

| SEQ ID NO | Название | Описание | Последовательность |
|-----------|------------------------------|----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | | | CGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGT ATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTT CTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTT TATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGT GGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGCTGACGCAACC CCCCTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAG CTCCTTTCGGGACTTTCGCTTTCCTCCCTCCCTA TTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCCTGCCTTG CCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGC ACTGACAATTCCGTGGTGTGTCGGGGAAATCA TCGTCCTTTCCTTGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCA CCTGGATTCTGCGCGGGACGTCCTTCTGCTACG TCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCTT CCCGCGGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTC CGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGA TCTCCCTTTGGGGCCGCCTCCCCGC |
| 11 | BGH pA | | CTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTG CCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGG TGCCACTCCCCTGTCTTTCCTAATAAAAATGA GGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCA TTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACA GCAAGGGGGAGGATTGGGAAGAGAATAGCAG GCATGCTGGGGA |
| 12 | hRetGC1 [NM_000 180.4] | | MTACARRAGGLPDPGLCGPAWWAPSLPRLPRAL PRLPLLLLLLLLQPPALSAVFTVGVLGPWACDPIF SRARPDLAARLAAARLNRPGLAGGPRFEVALLP EPCRTPGSLGAVSSALARVSGLVGPVNPAACRPA ELLAEAGIALVPWGCPWTQAEGTTAPAVTPAA DALYALLRAFGWARVALVTAPQDLWVEAGRSL TALRARGLPVASVTSMEPLDLSGAREALRKVRD GPRVTAVIMVMHSVLLGGEEQRYLLEAAEELGL TDGSLVFLPFDTHYALSPGPEALAAANSSQLRR |

| SEQ ID NO | Название | Описание | Последовательность |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------|----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | | | <p>AHDAVLTLTRHCPSEGSVLDLRRRAQERRELPD LNLQQVSPFLGTIYDAVFLLRGVAEARAAAGGR WVSGAAVARHIRDAQVPGFCGDLGGDEEPPFVL LDTDAAGDRLFATYMLDPARGSFLLSAGTRMHFP RGGAPGPDPSCWFDPNNICGGGLEPGLVFLGFL LVVGMGLAGAFLAHYVRHRLLMQMVSGPNKII LTVDDITFLHPHGGTSRKVAQGSRSSLGARSMSDI RSGPSQHLDSPNIGVYEGDRVWLKKFPGDQHIAI RPATKTAFSKLQELRHENVALYLGLFLARGAEGP AALWEGNLAVVSEHCTRGSLLQDLLAQREIKLDW MFKSSLLDLIKGIRYLHHRGVAHGRLKSRNCIV DGRFVLKITDHGHGRLLAQAQVLPPEPPRAEDQLW TAPELLRDPALERRGTLAGDVFSLAIIHQEVVCRS APYAMLELTPEEVVQVRVRSPPPLCRPLVSMDQAP VECILLMKQCWAEQPELRPSMDHTFDLDFKNINKG RKTNIIDSMLRMLEQYSSNLEDLIRERTEEELEK QKTDRLLTQMLPPSVAEALKTGTPVEPEYFEQVT LYFSDIVGFTTISAMSEPIEVVDLLNDLYTLFDAII GSHDVYK VETIGDAYMVASGLPQRNGQRHAAEI ANMSLDILSAVGTFRMRHMPEVPVRIRIGLHSGP CVAGVVGLTMPRYCLFGDTVNTASRMESTGLPY RIHVNLSTVGILRALDSGYQVELRGRTELKKGKA EDTFWL VGRRGFNKPIPKPPDLQPGSSNHGISLQE IPPERRRKLEKARPGQFS</p> |
| 13 | hGUCY2 D (пример 1 для кодон- оптимизи рованной последова | | <p>ATGACAGCCTGTGCCAGGAGAGCTGGTGGGCT TCCTGACCCTGGGCTCTGTGGTCCAGCTTGGTG GGCTCCCTCCCTGCCAGACTCCCCAGGGCCCT GCCAGGCTCCCTCTCCTGCTGCTCCTGCTTCTG CTGCAGCCCCCTGCCCTCAGTGCAGTGTTCACT GTGGGGGTCTGGGGCCCTGGGCTTGTGACCCC ATCTTCTCTAGGGCTAGACCTGACCTGGCTGCC AGGCTGGCTGCAGCCAGGCTGAACAGGGACCC</p> |

| SEQ ID NO | Название | Описание | Последовательность |
|--------------|----------------|----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | тельность) | | TGGCCTGGCAGGGGGTCCCAGGTTTGAGGTAG CCCTGCTGCCAGAGCCTTGCAGGACACCAGGCT CCCTGGGGGCAGTGTCTCTGCCCTGGCCAGAG TGTCAGGCCTAGTGGGTCTGTGAACCCTGCAG CCTGCAGACCAGCAGAGCTGCTGGCTGAAGAA GCTGGGATAGCACTGGTGCCCTGGGGCTGCCCC TGGACTCAGGCTGAGGGCACACAGCCCCTGC AGTGACCCCAGCTGCAGATGCCCTCTATGCCCT GCTTAGAGCATTTGGCTGGGCCAGAGTGGCCCT GGTCACTGCCCCTCAGGACCTGTGGGTGGAGG CAGGAAGGTCAGTGTCCACAGCACTCAGGGCC AGAGGCCTGCCTGTGGCCTCTGTGACTTCCATG GAGCCCTTGGACCTGTCTGGAGCCAGAGAGGC CCTGAGGAAGGTTAGAGATGGGCCCAGGGTCA CAGCAGTGATCATGGTGATGCACAGTGTGCTGC TGGGTGGAGAGGAGCAGAGGTACCTCCTGGAG GCTGCAGAGGAGCTGGGCCTGACAGATGGCTC CCTGGTCTTCCTGCCCTTTGACACCATCCACTAT GCCTTGTCCCCAGGCCAGAGGCCTTGGCTGCA CTAGCCAACAGCTCCCAGCTTAGAAGGGCCCA TGATGCAGTGCTCACCTCACCAGACACTGTCC CTCTGAAGGCTCAGTGCTGGACAGCCTGAGAA GGGCTCAAGAGAGGAGAGAGCTGCCCTCTGAC CTCAATCTGCAGCAGGTCTCCCCACTCTTTGGC ACCATCTATGATGCTGTCTTCTTGCTGGCAAGG GGAGTGGCAGAAGCCAGAGCTGCTGCAGGTGG CAGATGGGTGTCAGGAGCAGCTGTGGCCAGGC ACATCAGGGATGCCAGGTCCCTGGCTTCTGTG GGGACCTAGGAGGAGATGAGGAGCCCCATTT GTGCTGCTAGACACAGATGCTGCAGGAGACAG GCTTTTTGCCACATACATGCTGGATCCTGCCAG GGGCTCCTTCCTCAGTGCAGGTACCAGGATGCA |

| SEQ ID NO | Название | Описание | Последовательность |
|--------------|----------|----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | | | CTTCCCAAGAGGGGGATCAGCACCTGGACCTG ACCCCAGCTGCTGGTTTGATCCAAACAACATCT GTGGTGGAGGACTGGAGCCTGGCCTTGTCTTTC TTGGCTTCCTCCTGGTGGTTGGGATGGGGCTGG CTGGGGCCTTCCTGGCCCATTATGTGAGGCACA GGCTACTTCACATGCAAATGGTCTCAGGCCCA ACAAGATCATCCTGACTGTGGATGACATCACCT TTCTCCACCCACATGGGGGCACCTCTAGAAAGG TGGCCCAGGGGAGTAGATCAAGTCTGGGTGCC AGGAGCATGTCAGACATTAGGTCTGGCCCCAG CCAACACTTGGACAGCCCCAACATTGGTGTCTA TGAGGGAGACAGGGTTTGGCTGAAGAAATTCC CAGGGGATCAGCACATAGCTATCAGGCCAGCA ACCAAGACAGCCTTCTCCAAGCTCCAGGAGCTC AGGCATGAGAATGTGGCCCTCTACCTGGGGCTT TTCTGGCTAGGGGAGCAGAAGGCCCTGCAGC CCTCTGGGAGGGCAACCTGGCTGTGGTCTCAGA GCACTGCACCAGGGGCTCTCTTCAGGACCTCCT TGCTCAGAGAGAAATAAAGCTGGACTGGATGT TCAAGTCCTCCCTCCTGCTGGACCTTATCAAGG GAATAAGGTATCTGCACCATAGGGGAGTGGCT CATGGGAGACTGAAGTCAAGAACTGCATAGT GGATGGCAGATTTGTA CTCAAGATCACTGACCA TGGCCATGGGAGACTGCTGGAAGCACAGAAGG TGCTACCTGAGCCTCCCAGAGCTGAGGACCAG CTGTGGACAGCCCCTGAGCTGCTTAGGGACCCA GCCCTGGAGAGGAGAGGAACCCTGGCAGGAGA TGTCTTTAGCTTGGCCATCATCATGCAAGAAGT AGTGTGCAGAAGTGCCCTTATGCCATGCTGGA GCTCACTCCTGAGGAAGTGGTGCAGAGGGTGA GAAGTCCCCCTCCACTGTGTAGGCCCTTGGTGT CCATGGACCAGGCACCTGTTGAGTGTATCCTCC |

| SEQ ID NO | Название | Описание | Последовательность |
|--------------|-------------|----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | | | TGATGAAGCAGTGCTGGGCAGAGCAGCCTGAA CTTAGACCTCCATGGACCACACCTTTGACCTG TTCAAGAACATCAACAAGGGCAGGAAGACCAA CATCATTGACTCAATGCTTAGAATGCTGGAGCA GTA CTCTAGTAACCTGGAGGATCTGATCAGGG AGAGGACAGAGGAGCTGGAGCTGGAAAAGCA GAAGACAGACAGACTGCTTACACAGATGCTGC CTCCTTCTGTGGCTGAGGCCTTGAAGACAGGGA CACCAGTGGAGCCTGAGTACTTTGAGCAAGTG ACACTGTACTTTAGTGACATTGTGGGCTTCACC ACCATCTCTGCCATGAGTGAGCCCATTGAGGTT GTGGACCTGCTCAATGATCTCTACACTCTTT GATGCCATCATTGGTTCCCATGATGTCTACAAG GTGGAGACAATAGGGGATGCCTATATGGTGGC CTCTGGGCTGCCCCAGAGGAATGGGCAGAGGC ATGCTGCAGAGATTGCCAACATGTCACTGGAC ATCCTCAGTGCTGTGGGCACTTTCAGGATGAGG CATATGCCTGAGGTTCCAGTGAGGATCAGAAT AGGCCTGCACAGTGGTCCATGTGTGGCAGGGG TGGTGGGCCTCACCATGCCAGGTA CTGCCTGT TTGGGGACACAGTCAACACTGCCAGTAGAATG GAGTCCACTGGGCTGCCTTACAGAATCCATGTG AACTTGAGCACTGTGGGGATTCTCAGGGCTCTG GACAGTGGCTACCAGGTGGAGCTGAGGGGCAG GACTGAGCTGAAGGGCAAGGGGGCAGAGGAC ACTTTCTGGCTAGTGGGCAGAAGAGGCTTCAAC AAGCCCATCCCCAAACCCCTGACCTGCAACCA GGGTCCAGCAACCATGGCATCAGCCTGCAGGA GATCCCACCTGAGAGAAGGAGAAAGCTGGAGA AGGCCAGGCCAGGCCAGTTCTCTTGA |
| 14 | hGUCY2 D | | ATGACAGCCTGTGCCAGAAGGGCAGGTGGGCT TCCAGACCCAGGGCTCTGTGGTCCTGCTTGGTG |

| SEQ ID NO | Название | Описание | Последовательность |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------|----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | (пример 2 для кодон- оптимизи- рованной последова- тельности) | | GGCTCCCTCCCTGCCAGACTCCCCAGAGCCCT GCCAGGCTCCCCCTCCTGCTGCTCCTGCTTCT GCTGCAGCCCCCAGCCCTCAGTGCTGTGTTAC AGTGGGGGTCCTGGGCCCCTGGGCTTGTGACCC CATCTTCTCTAGGGCTAGGCCTGACCTGGCAGC CAGGCTGGCAGCTGCCAGACTGAACAGGGACC CTGGCCTGGCAGGAGGTCCCAGGTTTGAGGTA GCTCTGCTGCCAGAGCCTTGCAGAACACCTGGC AGTCTGGGGGCTGTGTCCAGTGCCTGGCCAG AGTGTCAGGCTTGGTGGGTCCCTGTGAACCCTGC AGCCTGCAGACCAGCTGAGCTGCTGGCTGAAG AAGCTGGGATTGCTCTGGTGCCCTGGGGCTGCC CCTGGACCCAGGCTGAGGGCACACAGCCCCT GCTGTGACCCCAGCTGCAGATGCCCTCTATGCC CTGCTTAGGGCATTGGCTGGGCCAGGGTGGCC CTGGTCACAGACCCCAGGACCTGTGGGTGGA GGCTGGAAGGTCACTGTCCACTGCACTCAGGG CCAGGGGCCTGCCTGTGGCCTCAGTGACTTCCA TGGAGCCCTTGGACCTGTCTGGAGCCAGGGAG GCCCTGAGGAAGGTTAGAGATGGGCCAGGGT CACAGCAGTGATCATGGTGATGCACAGTGTGCT GCTGGGTGGTGAGGAGCAGAGGTACCTCCTGG AGGCTGCAGAGGAGCTGGGCCTGACAGATGGC TCCCTGGTCTTCCTGCCCTTTGACACCATCCACT ATGCCTTGTCACCAGGCCCTGAGGCCTTGGCTG CACTGGCCAACAGCTCCCAGCTTAGAAGGGCC CATGATGCTGTGCTCACCCCTACTAGACTGT CCCTCTGAAGGCAGTGTGCTGGACAGCCTGAG AAGGGCTCAAGAGAGAAGGGAGCTGCCCTCTG ACCTCAATCTGCAGCAGGTCTCCCCACTCTTTG GCACCATCTATGATGCTGTCTTCTTGCTGGCAA GGGGTGTGGCAGAAGCCAGAGCTGCTGCAGGT |

| SEQ ID NO | Название | Описание | Последовательность |
|--------------|----------|----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | | | GGCAGATGGGTGTCTGGAGCAGCTGTGGCCAG GCACATCAGGGATGCACAGGTCCTGGCTTCTG TGGGACTTGGGAGGAGATGAGGAGCCCCAT TTGTGCTGCTGGACACAGATGCTGCAGGAGAC AGACTTTTTGCCACATACATGCTGGATCCTGCC AGGGGCTCCTTCTCTCTGCTGGTACCAGAATG CACTTCCCTAGAGGGGGATCAGCACCTGGACCT GACCCCTCATGCTGGTTTGATCCAAACAACATC TGTGGTGGAGGACTGGAGCCAGGCCTTGTCTTT CTTGGCTTCTCCTGGTGGTTGGGATGGGGCTG GCTGGGGCCTTCTGGCCATTATGTGAGGCAC AGGTTGCTTCACATGCAAATGGTCTCAGGCCCC AACAAAGATCATCCTGACTGTGGATGACATCACC TTTCTCCACCCACATGGGGGCACCTCTAGAAAG GTGGCCAGGGGAGTAGATCAAGTCTGGGTGC CAGAAGCATGTCAGACATTAGGAGTGGCCCA GCCAACACTTGGACAGCCCCAACATTGGTGTCT ATGAGGGAGACAGGGTTTGGCTGAAGAAATTC CCAGGGGATCAGCACATAGCTATCAGACCAGC AACCAAGACTGCCTTCTCCAAGCTCCAGGAGCT CAGACATGAGAATGTGGCCCTCTACCTGGGGCT TTTCTGGCTAGGGGAGCAGAAGGCCCTGCTGC CCTCTGGGAGGGCAACCTGGCTGTGGTCTCAGA GCACTGCACTAGAGGCTCTCTTCAGGACCTCCT TGCTCAGAGAGAAATAAAGCTGGACTGGATGT TCAAGTCCTCCCTCCTGCTGGACCTTATCAAGG GAATAAGGTATCTGCACCATAGGGGTGTGGCT CATGGGAGGCTGAAGTCAAGAACTGCATAGT GGATGGCAGATTTGTA CTCAAGATCACTGACCA TGGCCATGGGAGACTGCTGGAAGCACAGAAGG TGCTGCCAGAGCCTCCAGAGCAGAGGACCAG CTGTGGACAGCCCCTGAGCTGCTTAGGGACCCA |

| SEQ ID NO | Название | Описание | Последовательность |
|--------------|----------|----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | | | <p>GCCCTGGAGAGAAGGGGAACACTGGCTGGAGA TGTCTTTAGCTTGGCCATCATCATGCAAGAAGT AGTGTGCAGGAGTGCCCCTTATGCCATGCTGGA GCTCACTCCAGAGGAAGTGGTGCAGAGGGTGA GAAGCCCACCTCCACTGTGTAGACCCTTGGTGT CCATGGACCAGGCACCTGTGGAGTGTATCCTCC TGATGAAGCAGTGCTGGGCAGAGCAGCCTGAA CTTAGGCCCTCCATGGACCACACCTTTGACCTG TTCAAGAACATCAACAAGGGCAGAAAGACCAA CATCATTGACTCAATGCTTAGAATGCTGGAGCA GTACTCTAGTAACCTGGAGGATCTGATCAGGG AGAGGACTGAGGAGCTGGAGCTGGAAAAGCAG AAGACAGACAGACTGCTTACACAGATGCTGCC TCCCTCTGTGGCTGAGGCCTTGAAGACAGGGAC ACCAGTGGAGCCTGAGTACTTTGAGCAAGTGA CACTGTACTTTAGTGACATTGTGGGCTTCACCA CCATCTCTGCCATGAGTGAGCCATTGAGGTTG TGGACCTGCTCAATGATCTCTACACACTCTTTG ATGCCATCATTGGTTCCCATGATGTCTACAAGG TGGAGACAATAGGGGATGCCTATATGGTGGCC TCTGGGCTGCCCCAGAGGAATGGGCAGAGGCA TGCTGCAGAGATTGCCAACATGTCACTGGACAT CCTCAGTGCTGTGGGCACTTTCAGGATGAGACA TATGCCTGAGGTTCTGTGAGGATCAGGATAGG CCTGCACTCTGGTCCATGTGTGGCAGGAGTGGT GGCCTCACCATGCCTAGATACTGCCTGTTTGG GGACACAGTCAACACAGCCTCCAGGATGGAGT CCACAGGGCTGCCTTACAGGATCCATGTGAACT TGAGCACTGTGGGGATTCTCAGGGCTCTGGACT CAGGCTACCAGGTGGAGCTGAGGGGCAGGACT GAGCTGAAGGGCAAGGGAGCTGAGGACACTTT CTGGCTTGTGGGCAGAAGGGGCTTCAACAAGC</p> |

| SEQ ID NO | Название | Описание | Последовательность |
|--------------|----------|----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | | | CCATCCCCAAACCACCTGACCTGCAACCAGGGT CCAGCAACCATGGCATCAGCCTGCAGGAGATC CCACCTGAGAGGAGAAGGAAGCTGGAGAAGGC AAGGCCAGGCCAGTTCTCTTGA |

[0164] Хотя приведенное выше письменное описание настоящего изобретения позволяет специалисту с обычной квалификацией создать и использовать то, что в настоящее время считается лучшим его вариантом, специалисты с обычной квалификацией поймут и оценят существование вариаций, комбинаций и эквивалентов конкретных вариантов осуществления, способов и примеров в данном документе.

Формула изобретения

Формула изобретения

1. Экспрессирующая конструкция, содержащая
 - (a) промоторную последовательность, которая обеспечивает экспрессию в фоторецепторных клетках, и
 - (b) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую гуанилилциклазу 1 мембраны сетчатки (RetGC1); где последовательность нуклеиновой кислоты функционально связана с промотором.
2. Экспрессирующая конструкция по п. 1, где промоторная последовательность представляет собой промоторную последовательность родопсинкиназы (RK) или цитомегаловируса (CMV).
3. Экспрессирующая конструкция по п. 2, где промоторная последовательность содержит последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID: NO:7.
4. Экспрессирующая конструкция по п. 3, где промоторная последовательность содержит SEQ ID NO:7.
5. Экспрессирующая конструкция по п. 2, где промоторная последовательность содержит последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID: NO:8.
6. Экспрессирующая конструкция по п. 5, где промоторная последовательность содержит SEQ ID NO:8.
7. Экспрессирующая конструкция по любому из предыдущих пунктов, где экспрессирующая конструкция дополнительно содержит посттранскрипционный регуляторный элемент.
8. Экспрессирующая конструкция по п. 7, где посттранскрипционный регуляторный элемент включает посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE).
9. Экспрессирующая конструкция по п. 7, где посттранскрипционный регуляторный

элемент содержит последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO:10.

10. Экспрессирующая конструкция по п. 9, где посттранскрипционный регуляторный элемент содержит SEQ ID NO:10.

11. Экспрессирующая конструкция по любому из пп. 1-10, где последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая RetGC1, представляет собой ген RetGC1 дикого типа.

12. Экспрессирующая конструкция по любому из пп. 1-10, где последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая RetGC1, представляет собой кодон-оптимизированную последовательность.

13. Экспрессирующая конструкция по любому из пп. 1-10, где последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая RetGC1, содержит последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:13 или SEQ ID NO:14.

14. Экспрессирующая конструкция по п. 13, где последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая RetGC1, содержит SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:13 или SEQ ID NO:14.

15. Экспрессирующая конструкция по любому из пп. 1-10, где последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая RetGC1, кодирует белок, содержащий последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO:12.

16. Экспрессирующая конструкция по п. 15, где последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая RetGC1, кодирует белок, содержащий SEQ ID NO: 12.

17. Экспрессирующая конструкция по любому из предыдущих пунктов, где экспрессирующая конструкция дополнительно содержит сигнал полиаденилирования.

18. Экспрессирующая конструкция по п. 17, где сигнал полиаденилирования содержит сигнал полиаденилирования бычьего гормона роста (BGH-полиА).

19. Экспрессирующая конструкция по п. 17, где сигнал полиаденилирования содержит последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO:11.

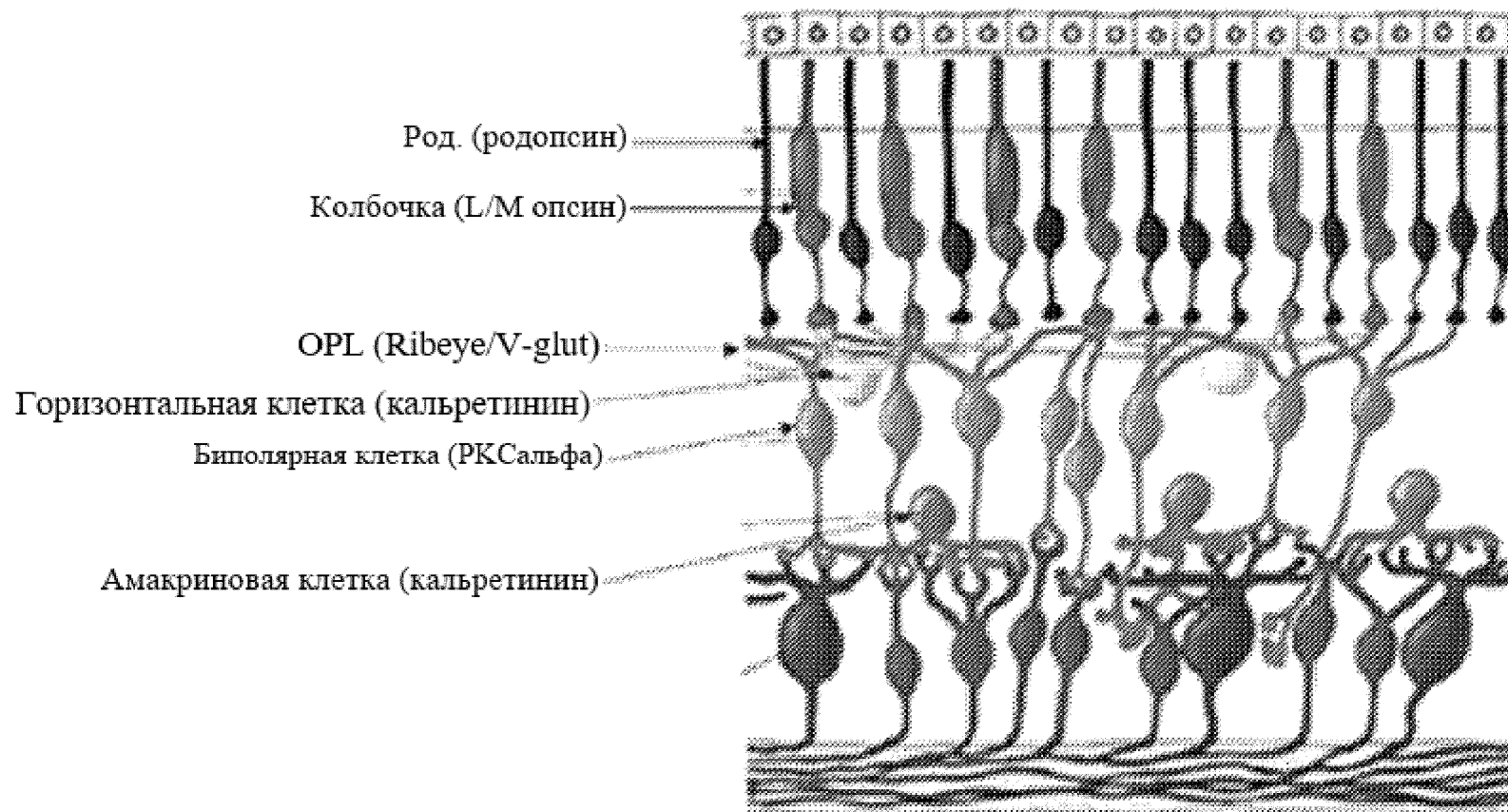
20. Экспрессирующая конструкция по п. 19, где сигнал полиаденилирования содержит SEQ ID NO:11.
21. Экспрессирующая конструкция по любому из предыдущих пунктов, где экспрессирующая конструкция содержит последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:1-4.
22. Экспрессирующая конструкция по любому п. 21, где экспрессирующая конструкция содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:1-4.
23. Вектор, содержащий экспрессирующую конструкцию по любому из предыдущих пунктов.
24. Вектор по п. 23, где вектор представляет собой вирусный вектор.
25. Вектор по п. 24, где вектор представляет собой вектор аденоассоциированного вируса (AAV).
26. Вектор по п. 25, где вектор содержит геном, полученный из серотипа AAV2 AAV.
27. Вектор по п. 25 или п. 26, где вектор содержит капсид, полученный из AAV7m8.
28. Фармацевтическая композиция, содержащая вектор по любому из пп. 23-27 и фармацевтически приемлемый носитель.
29. Способ лечения заболевания сетчатки у субъекта, нуждающегося в этом, где заболевание сетчатки связано с одной или более мутациями в гене GUCY2D, причем способ включает введение субъекту вектора по любому из пп. 23-27 или фармацевтической композиции по п. 28.
30. Способ по п. 29, где заболевание сетчатки представляет собой колбочково-палочковую дистрофию (CRD) или врожденный амавроз Лебера типа 1 (LCA1).
31. Способ по п. 30, где заболевание сетчатки представляет собой LCA1.

32. Способ повышения экспрессии цГМФ-специфической субъединицы β 3',5'-циклической фосфодиэстеразы (PDE6 β) палочки у субъекта, нуждающегося в этом, причем способ включает введение субъекту вектора по любому из пп. 23-27 или фармацевтической композиции по п. 28.

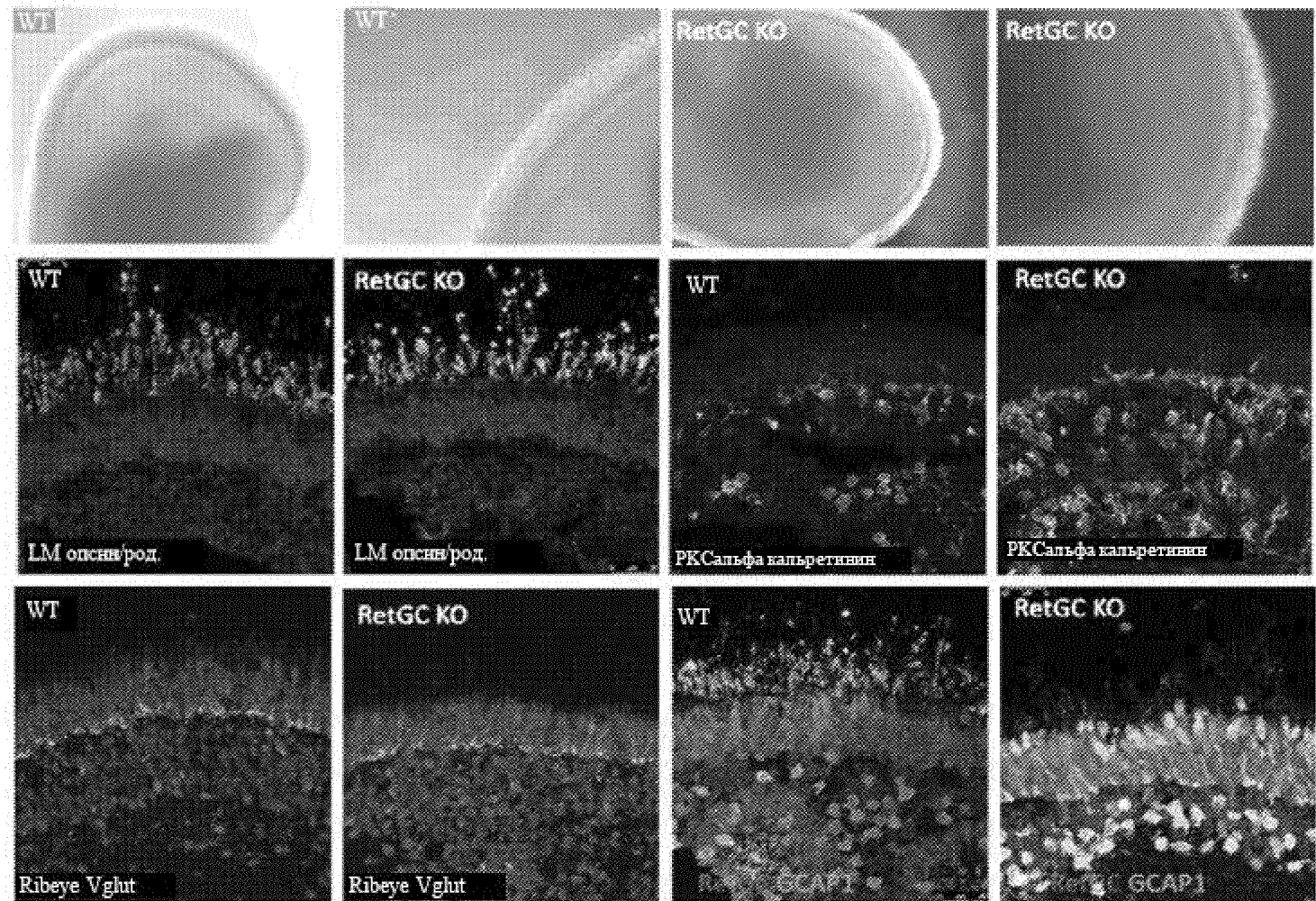
33. Способ повышения уровней циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ) в фоторецепторе у субъекта, нуждающегося в этом, причем способ включает введение субъекту вектора по любому из пп. 23-27 или фармацевтической композиции по п. 28.

34. Способ по любому из пп. 29-33, где вектор или фармацевтическую композицию вводят посредством внутриглазной инъекции.

35. Способ по п. 34, где вектор или фармацевтическую композицию вводят в центральную часть сетчатки субъекта.

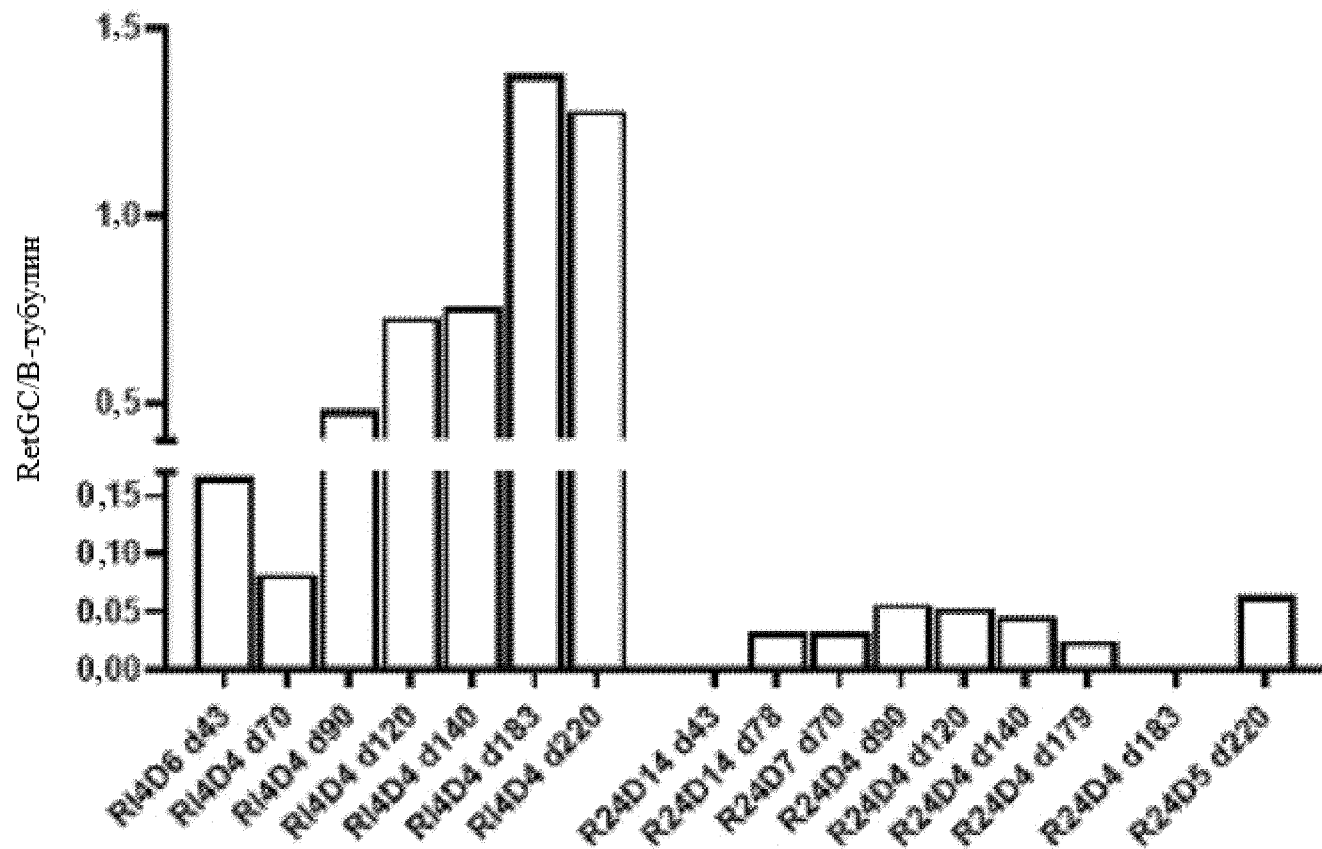


Фиг. 1

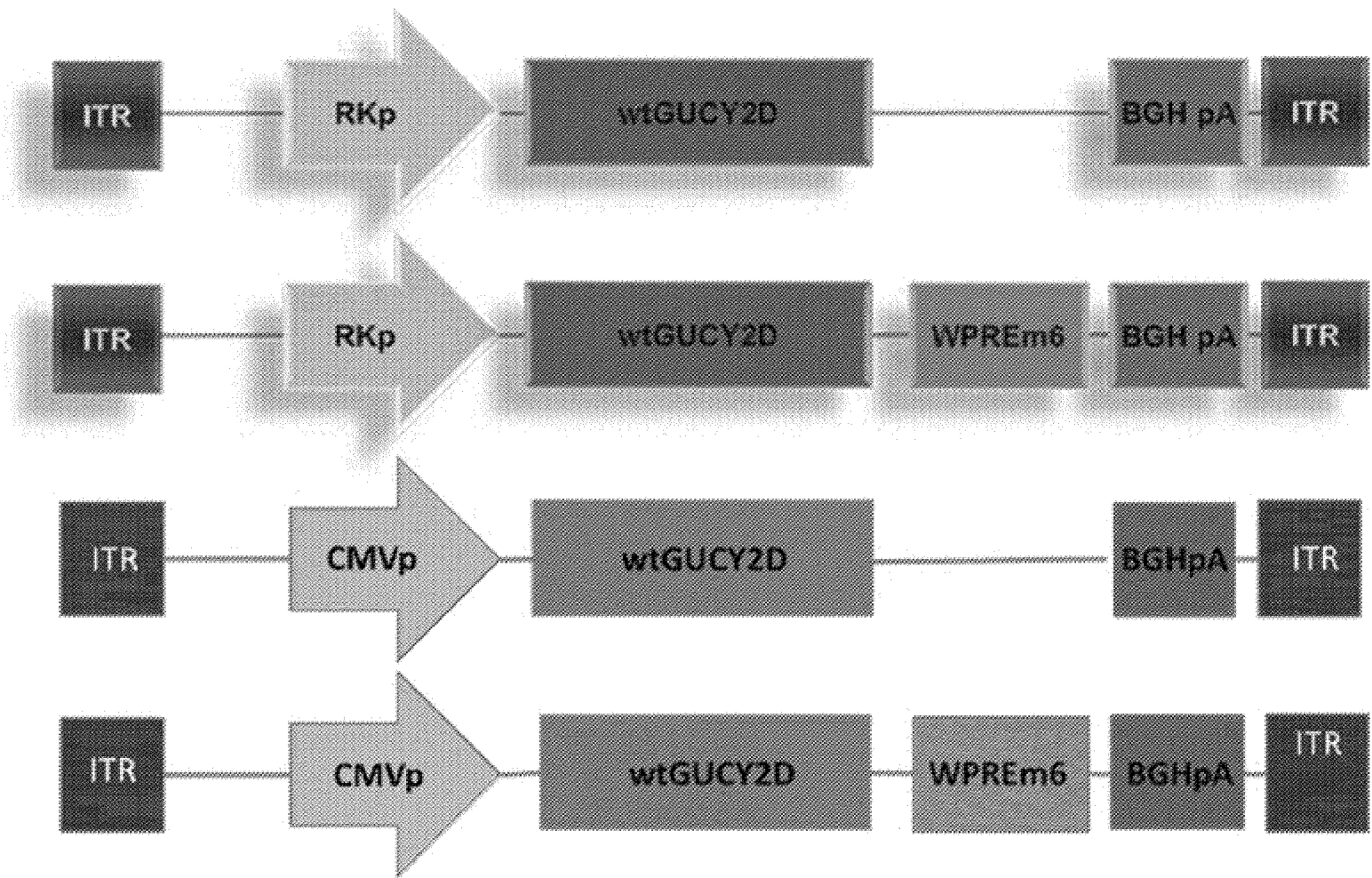


Фиг. 2

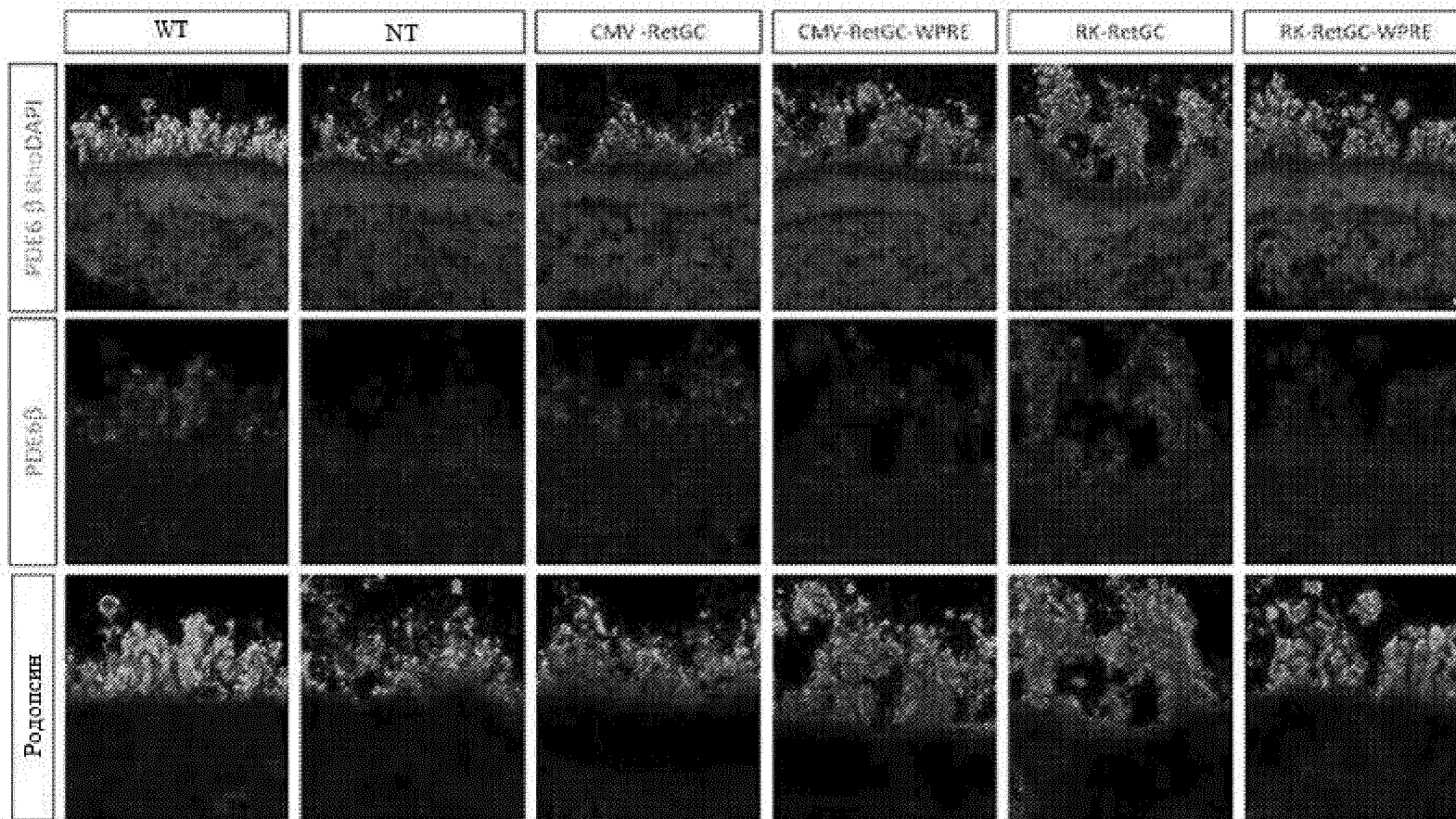
RI wt по сравнению с R24 ко



Фиг. 3

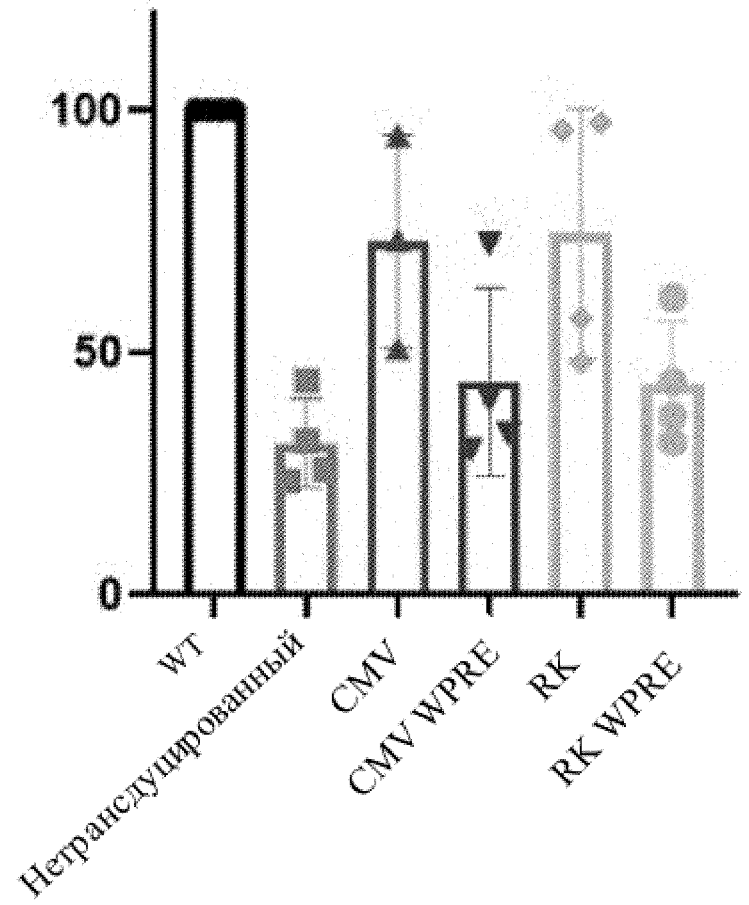


Фиг. 4

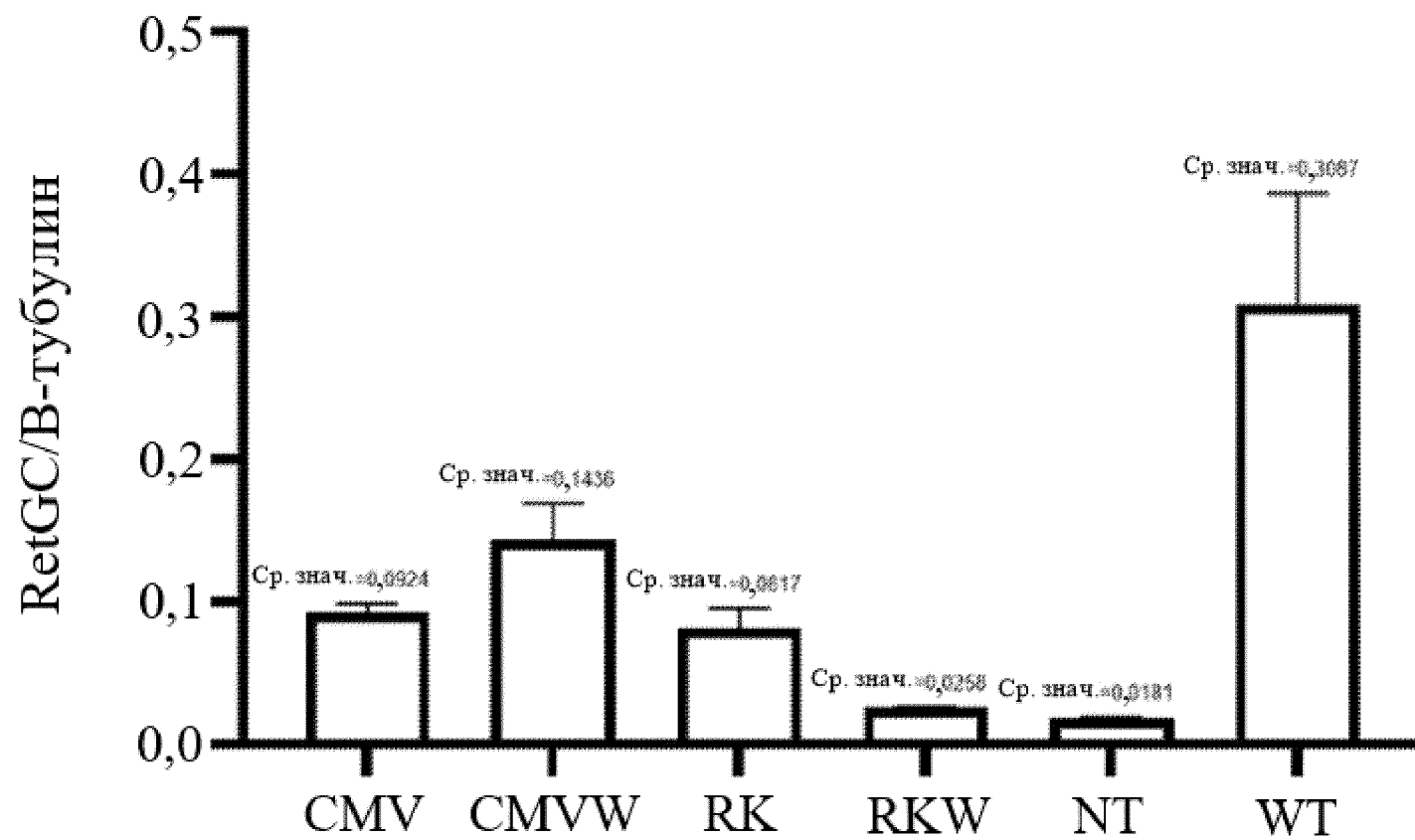


Фиг. 5

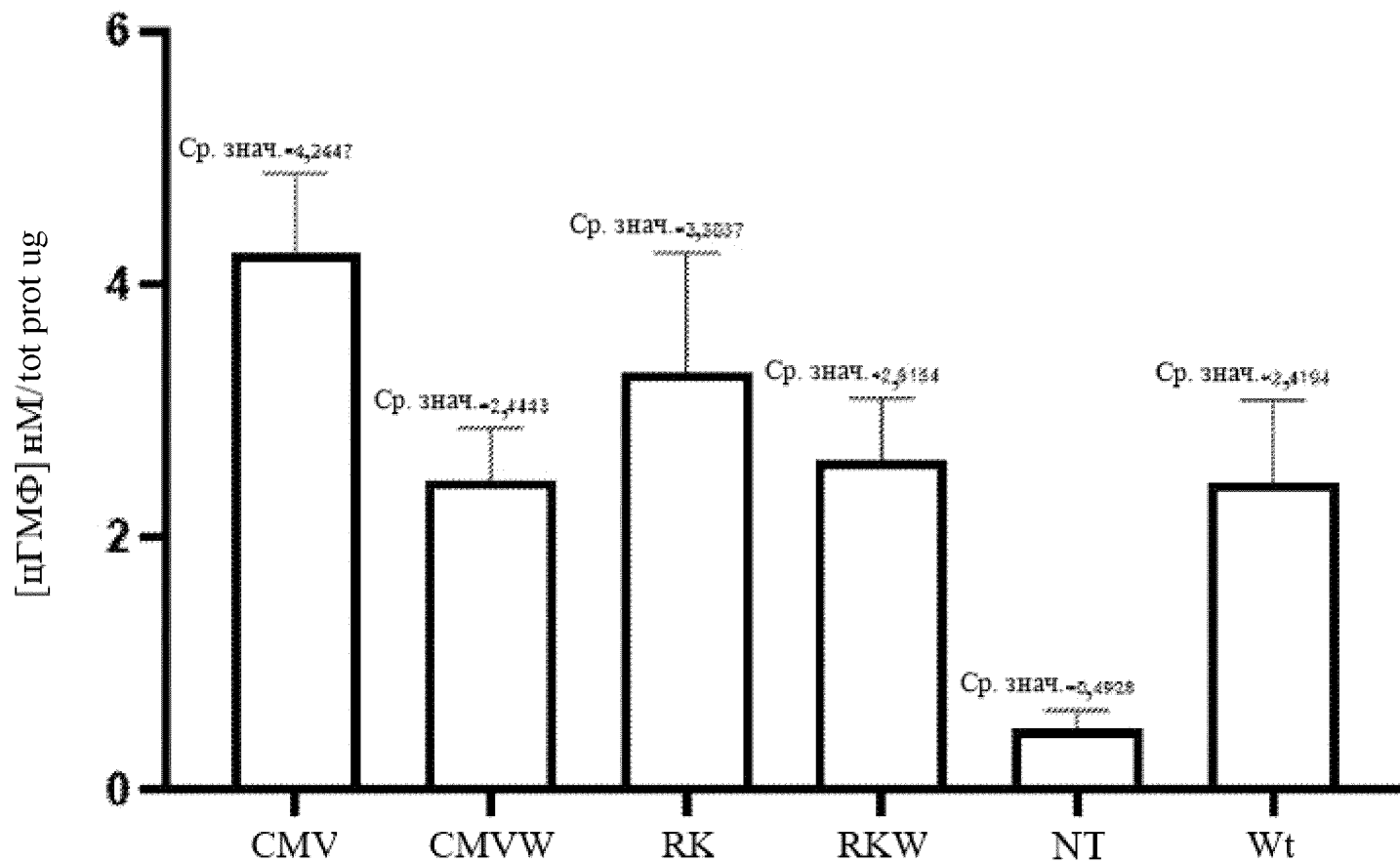
Интенсивность PDE6. (% WT)



Фиг. 6



Фиг. 7



Односторонний дисперсионный анализ - критерий Краскела-Уоллиса: $p=0,0043$ CMV по сравнению с NT
 $p=0,0494$ RK по сравнению с NT

Фиг. 8