



(51) МПК  
*C12N 15/63* (2006.01)  
*C12N 15/86* (2006.01)  
*A61K 48/00* (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ**

(52) СПК  
*C12N 15/63* (2021.05); *C12N 15/86* (2021.05); *A61K 48/00* (2021.05)

(21)(22) Заявка: 2019103488, 07.07.2017

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
 07.07.2017

Дата регистрации:  
 24.01.2022

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:  
 08.07.2016 US 62/359,777

(43) Дата публикации заявки: 10.08.2020 Бюл. № 22

(45) Опубликовано: 24.01.2022 Бюл. № 3

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на  
 национальной фазе: 08.02.2019

(86) Заявка РСТ:  
 US 2017/041122 (07.07.2017)

(87) Публикация заявки РСТ:  
 WO 2018/009814 (11.01.2018)

Адрес для переписки:  
 119019, Москва, ул. Гоголевский бульвар, 11

(72) Автор(ы):

БЕННЕТТ, Джин (US),  
 СУНЬ, Цзюньвей (US),  
 ВАСИРЕДДИ, Видиуллата (US)

(73) Патентообладатель(и):

ЗЕ ТРАСТИС ОФ ЗЕ ЮНИВЕРСИТИ ОФ  
 ПЕНСИЛЬВАНИЯ (US)

(56) Список документов, цитированных в отчете  
 о поиске: WO 2016019364 A1, 04.02.2016.

HAMILTON M.M et al, Repeated administration  
 of Adenovector in the Eye results in efficient  
 gene delivery. Investigative ophthalmology and  
 visual sciences, January, 2006, vol.47, N, p.299-  
 305, DOI: 10.1074/jbc.M706372200. US 2014/  
 0010861 A1, 09.01.2014. ALBAKRI F, et al,  
 Elevation deficiency in children with recessive  
 (см. прод.)

R U 2 7 6 4 9 2 0 C 2

**(54) СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ НАРУШЕНИЙ И ЗАБОЛЕВАНИЙ,  
 СВЯЗАННЫХ С RDH12**

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии и медицине, а именно к коррекции нефункционального, дефектного или неадекватно экспрессируемого нативного RDH12. Предлагаются кодон-оптимизированные нуклеотидные последовательности для RDH12, а также рекомбинантные вирусные векторы, такие как AAV, экспрессионные кассеты, провирусные плазмида или другие плазмида, содержащие кодон-оптимизированную последовательность для функционального RDH12. Предлагаются рекомбинантные векторы, которые экспрессируют

функциональный RDH12. Композиции, содержащие эти кодон-оптимизированные последовательности, пригодные для использования в способах лечения, замедления или остановки конкретных приводящих к слепоте заболеваний, возникающих вследствие отсутствия, дефицита или несоответствующей экспрессии RDH12. Другие композиции и способы предлагаются для коррекции нефункционального, дефектного или неадекватно экспрессируемого нативного RDH12. Изобретение позволяет замедлить или остановить конкретные, приводящие к слепоте заболевания, возникающие

R U 2 7 6 4 9 2 0 C 2

вследствие отсутствия, дефицита или  
несоответствующей экспрессии RDH12. 10 н. и 4  
з.п. ф-лы, 10 ил., 1 табл., 5 пр.

(56) (продолжение):

RDH12-Related Retinopathy, Journal of AAPOS, December, 2015, vol.19, N 6, p. 568-570. ИВАНОВА М.Е. и др.  
Современные способы генетического лечения дистрофий сетчатки, Российский офтальмологический журнал,  
том 6, N 4, 2013, с.103-110.

R U 2 7 6 4 9 2 0 C 2

R U 2 7 6 4 9 2 0 C 2

R U 2 7 6 4 9 2 0 C 2

RUSSIAN FEDERATION



(19)

RU (11)

2 764 920<sup>(13)</sup> C2

(51) Int. Cl.  
*C12N 15/63* (2006.01)  
*C12N 15/86* (2006.01)  
*A61K 48/00* (2006.01)

FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC  
*C12N 15/63* (2021.05); *C12N 15/86* (2021.05); *A61K 48/00* (2021.05)

(21)(22) Application: 2019103488, 07.07.2017

(24) Effective date for property rights:  
07.07.2017

Registration date:  
24.01.2022

Priority:

(30) Convention priority:  
08.07.2016 US 62/359,777

(43) Application published: 10.08.2020 Bull. № 22

(45) Date of publication: 24.01.2022 Bull. № 3

(85) Commencement of national phase: 08.02.2019

(86) PCT application:  
US 2017/041122 (07.07.2017)

(87) PCT publication:  
WO 2018/009814 (11.01.2018)

Mail address:  
119019, Moskva, ul. Gogolevskij bulvar, 11

(72) Inventor(s):

BENNETT, Dzhin (US),  
SUN, Tszyunvej (US),  
VASIREDDI, Vidiullata (US)

(73) Proprietor(s):

ZE TRASTIS OF ZE YUNIVERSITI OF  
PENSILVANIYA (US)

(54) METHODS AND COMPOSITIONS FOR THE TREATMENT OF DISORDERS AND DISEASES RELATED TO RDH12

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology; medicine.

SUBSTANCE: invention relates to biotechnology and medicine, namely to the correction of non-functional, defective or inadequately expressed native RDH12. Codon-optimized nucleotide sequences for RDH12 are proposed, as well as recombinant viral vectors, such as AAV, expression cassettes, proviral plasmids or other plasmids containing a codon-optimized sequence for functional RDH12. Recombinant vectors that express codon-optimized functional RDH12 are proposed. Compositions containing these codon-optimized sequences are

proposed, suitable for use in methods for treating, slowing down or stopping specific blindness-causing diseases resulting due to the absence, deficiency or inappropriate expression of RDH12. Other compositions and methods are proposed for the correction of non-functional, defective or inadequately expressed native RDH12.

EFFECT: invention makes it possible to slow down or stop specific blindness-causing diseases that occur due to the absence, deficiency or inappropriate expression of RDH12.

14 cl, 10 dwg, 1 tbl, 5 ex

## ВКЛЮЧЕНИЕ ПОСРЕДСТВОМ ССЫЛКИ МАТЕРИАЛОВ, ПОДАННЫХ В ЭЛЕКТРОННОЙ ФОРМЕ

Заявитель посредством ссылки включает в настоящий документ перечень последовательностей, поданный в электронной форме вместе с настоящим документом.

5 Данный файл назван UPN-16-7699PCT\_ST25.txt, имеет размер 9 кБ и датирован 5 июля 2017 г.

### УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Ретинол-дегидрогеназы/редуктазы, которые расположены в фоторецепторных клетках и ПЭС (пигментный эпителий сетчатки), катализируют важные реакции

10 окисления-восстановления в зрительном цикле. Ген RDH12 ретинол-дегидрогеназы 12 (полностью транс-/9-цис/11-цис) (14q23.3-q24.1) (MIM №608830) кодирует фермент с двойной специфичностью, экспрессируемый в сетчатке, который действует как на транс-, так и цис-ретиноидные субстраты. См., например, Thompson, DA et al, Nov. 2005, Human Mol. Genet., 14(24):3865-3875. Ряд мутаций человеческого гена RDH12 был связан с 15 определенными формами тяжелой аутосомно-рецессивной дистрофии сетчатки (арРД) с началом в детском возрасте. Например, дефекты этого гена являются причиной врожденного амавроза Лебера типа 13 и пигментной дегенерации сетчатки 53.

Врожденный амавроз Лебера (ВАЛ) - тяжелая дистрофия сетчатки, которая поражает приблизительно 1 человека из 80000 по всему миру. Это заболевание является аутосомно-рецессивным и проявляется в аномальном развитии фоторецепторов с рождения или в течение первых нескольких месяцев жизни. Такие отклонения приводят к серьезным нарушениям зрения и слепоте. ВАЛ, связанный с геном RDH12, является одной из наиболее редких форм ВАЛ. Только в около 2,7% случаев ВАЛ вызван мутацией гена RDH12.

25 Пигментная дегенерация сетчатки (ПДС) 53 - это другой вид дистрофии сетчатки, который относится к группе пигментных ретинопатий. Пигментная дегенерация сетчатки характеризуется скоплениями пигмента сетчатки, видимыми при обследовании глазного дна, а также первичной потерей палочковых фоторецепторных клеток с последующей вторичной потерей колбочковых фоторецепторов. У пациентов, как правило, 30 наблюдается потеря ночного зрения и потеря среднего периферического поля зрения. По мере прогрессирования заболевания они теряют дальнее периферическое поле зрения и, в конечном итоге, центральное зрение. Ген RDH12 также связан с этим приводящим к слепоте заболеванием.

Существующие в настоящее время методы лечения таких приводящих к слепоте 35 заболеваний являются в основном поддерживающими и включают направление пациентов на программы для детей с нарушениями зрения, коррекцию аномалий рефракции, использование по возможности средств помощи при слабом зрении и, если возможно, доступ к реабилитационным/образовательным видам терапии. Пациенты, страдающие от заболевания, периодически проходят офтальмологический осмотр, а 40 пациенты с остаточным зрением обследуются на предмет наличия амблиопии, глаукомы или катаракты с соответствующим лечением. Методы терапии, предполагающие добавление гена, оцениваются на предмет лечения определенных форм врожденного амавроза Лебера (ВАЛ). См., например, патент США №8147823.

В данной области техники остается потребность в новых и эффективных инструментах 45 и способах для успешного лечения ВАЛ-13, ПДС-53 и других болезней глаз.

### СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Терапевтические композиции и способы, пригодные для лечения заболеваний глаз, включают в себя новые последовательности кДНК, оптимизированные с возможностью

кодирования функционального белка RDH12, а также доставку оптимизированных последовательностей субъекту с болезнью глаз. В одном варианте осуществления такие новые последовательности включают в себя плазмидные последовательности, которые можно упаковать в вирусные векторы. В других вариантах осуществления новые

5 провирусные плазмиды AAV и/или рекомбинантный AAV предоставляются для того, чтобы нести оптимизированные последовательности. Как обсуждается в настоящем документе, эти векторы продемонстрировали биологическую активность как *in vitro*, так и *in vivo*.

В одном аспекте предлагаются кодон-оптимизированные последовательности кДНК,

10 кодирующие функциональный RDH12 млекопитающего, предпочтительно человека.

В другом аспекте экспрессионная кассета включает в себя кодон-оптимизированную нуклеотидную последовательность, которая кодирует одну или более функциональных копий RDH12. В одном варианте осуществления экспрессионная кассета дополнительно

15 содержит кодон-оптимизированную нуклеотидную последовательность, которая кодирует одну или более функциональных копий RDH12, размещенных между 5' и 3' последовательностями ITR (англ. inverted terminal repeat - «инвертированный концевой повтор») AAV, функционально соединенных и находящихся под контролем регуляторных последовательностей, направляющих их экспрессию в клетке-хозяине.

В других аспектах предлагается вектор, который содержит одну или более

20 экспрессионных кассет, описанных в настоящем документе, а также предлагаются клетки-хозяева, которые содержат эти векторы или экспрессионные кассеты.

В другом аспекте провирусная плазмида содержит последовательности, кодирующие капсид AAV, последовательности инвертированных концевых повторов AAV и экспрессионную кассету, содержащую кодон-оптимизированную нуклеотидную

25 последовательность, которая кодирует нативный или мутировавший или кодон-оптимизированный RDH12, а также регулирующие экспрессию последовательности, которые направляют экспрессию кодируемого белка в клетке-хозяине. В некоторых вариантах осуществления плазмидные компоненты являются модульными.

В другом варианте осуществления рекомбинантный адено-ассоциированный вирус

30 (AAV) содержит капсидный белок AAV и нуклеотидную последовательность, кодирующую функциональный белок RDH12 или его фрагмент под контролем регуляторных последовательностей, которые экспрессируют RDH12 в фоторецепторных клетках субъекта. В одном варианте осуществления гAAV содержит капсид AAV8 или его вариант, либо капсид AAV7 или его вариант, либо капсид AAV2 или его вариант,

35 либо капсид AAV5 или его вариант.

В другом варианте осуществления гAAV содержит последовательности инвертированных концевых повторов AAV и экспрессионную кассету, содержащую кодон-оптимизированную нуклеотидную последовательность, которая кодирует функциональный RDH12, а также регулирующие экспрессию последовательности,

40 которые направляют экспрессию кодируемого белка в клетке-хозяине.

В еще одном аспекте фармацевтическая композиция содержит фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель, вспомогательное вещество и/или адьювант, а также оптимизированную нуклеотидную последовательность, кодирующую функциональный RDH12, и плазмиду, вектор или вирусный вектор, такой как гAAV, описанный конкретно

45 в данном документе. В одном варианте осуществления оптимизированная нуклеотидная последовательность находится под контролем регуляторных последовательностей, которые экспрессируют функциональный RDH12 в фоторецепторных клетках субъекта. В одном варианте осуществления композиция содержит множество копий

последовательностей, кодирующих функциональный RDH12. В другом варианте осуществления композиция содержит фармацевтически приемлемый носитель.

В дополнительном аспекте предлагается клетка, которая экспрессирует функциональный белок RDH12, кодируемый кодон-оптимизированной кДНК RDH12.

- 5 В одном варианте осуществления такая клетка представляет собой индуцированную плюрипотентную стволовую клетку (иПСК), которая была обработана системами редактирования генов, такими как система Crispr/Cas9, и связанными системами и компонентами, для нацеливания и коррекции мутаций в существующих в клетке последовательностях RDH12 или для вставки кодон-оптимизированных

- 10 последовательностей RDH12 с целью новой экспрессии в этой клетке.

В другом аспекте способ лечения RDH12-опосредованного заболевания у млекопитающего включает в себя введение нуждающемуся в этом субъекту кодон-оптимизированной кДНК RDH12, описанной в настоящем документе, или вектора, вируса, либо фармацевтических композиций, как описано в настоящем документе.

- 15 В другом аспекте способ лечения, замедления или остановки прогрессирования слепоты либо восстановления по меньшей мере частичного зрения у млекопитающего включает в себя введение или доставку субъекту оптимизированной нуклеотидной последовательности или ее фрагмента, кодирующих функциональный белок RDH12 или его фрагмент. В одном варианте осуществления способ использует любую из

- 20 композиций, описанных в настоящем документе.

В другом аспекте способ лечения, замедления или остановки прогрессирования слепоты либо восстановления по меньшей мере частичного зрения у млекопитающего включает в себя введение рекомбинантного адено-ассоциированного вируса (AAV), содержащего капсидный белок AAV и нуклеотидную последовательность, кодирующую 25 функциональный белок RDH12 или его фрагмент под контролем регуляторных последовательностей, которые экспрессируют RDH12 в фоторецепторных клетках субъекта, и фармацевтически приемлемого носителя. В одном варианте осуществления способ использует любую из композиций, описанных в настоящем документе.

- 30 В еще одном аспекте способ лечения заболевания глаз, вызванного экспрессией нефункционального или неправильно функционирующего RDH12, либо несоответствующими количествами или дефицитом RDH12, включает в себя введение субъекту с такой недостаточностью вектора, содержащего нативный или кодон-оптимизированный ген RDH12 под контролем подходящего промотора.

- 35 В еще одном аспекте способ лечения заболевания, связанного с дефицитом RDH12 или мутацией RDH12, включает в себя применение систем редактирования генов, таких как система Crispr/Cas9, и связанных систем и компонентов, для нацеливания и коррекции мутаций RDH12. В одном варианте осуществления коррекция включает в себя оптимизацию последовательности, кодирующей RDH12, *in vivo*.

- 40 В другом варианте осуществления предлагается способ лечения или предотвращения ВАЛ или ПДС, вызванных дефектом, дефицитом или мутацией RDH12, у нуждающегося в этом субъекте. Способ включает в себя (а) идентификацию субъекта с ВАЛ или ПДС, связанных с геном RDH12, или субъекта, находящегося в группе риска развития этих заболеваний; (б) проведение анализа генотипа и идентификацию мутации гена RDH12; (с) проведение неинвазивной визуализации и функциональных исследований сетчатки 45 и идентификацию зон с остаточными фоторецепторами, на которые может быть нацелена терапия; (д) введение субъекту эффективной концентрации композиции, содержащей вектор (например, рекомбинантный вирус), несущий нуклеотидную последовательность, кодирующую функциональный RDH12 под контролем промоторной последовательности,

которая экспрессирует продукт указанной последовательности в указанных фоторецепторных клетках, и фармацевтически приемлемый носитель, причем указанное заболевание предотвращается, прекращается или облегчается.

Другие аспекты и преимущества данных композиций и способов более подробно

<sup>5</sup> описаны в последующем детальном описании их предпочтительных вариантов осуществления.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На ФИГ. 1А-1В представлено выравнивание кодон-оптимизированного RDH12 (SEQ ID NO: 1; верхняя последовательность) с нативным RDH12 (SEQ ID NO: 3; нижняя <sup>10</sup> последовательность), демонстрирующее приблизительно 78%-ое сходство последовательностей. В этом выравнивании оценка составляет 787 бит (872), идентичности составляют 744/949 (78%); разрывы составляют 0/949 (0%); а две цепи представляют собой плюс-цепи.

На ФИГ. 2А-2F представлены 6 панелей, демонстрирующие экспрессию плазмида RDH12: левая (ФИГ. 2А) и правая (ФИГ. 2В) верхние панели демонстрируют нетрансформированный контроль; левая (ФИГ. 2С) и правая (ФИГ. 2D) средние панели демонстрируют трансформированные RDH12Myc клетки; левая нижняя панель демонстрирует трансформированные RDH12Myc клетки (ФИГ. 2Е); правая нижняя панель (ФИГ. 2F) представляет собой увеличение двух клеток из правой средней панели (ФИГ. <sup>20</sup> 2D).

На ФИГ. 2G представлен гель, демонстрирующий трансформированные RDH12Myc клетки COS-7, контрольные клетки COS\_7, трансформированные RDH12Myc клетки СНО, контрольные клетки СНО и два маркера молекулярной массы.

На ФИГ. 3 представлен гель, демонстрирующий экспрессию AAV2-RDH12Myc в иП <sup>25</sup> клетках RDH12. Эти клетки являются меченными, и показаны маркеры ММ.

На ФИГ. 4 представлен график, демонстрирующий соотношение А-волн перед засвечиванием и после засвечивания в инъецированной по сравнению с неинъецированной RDH12.myc сетчаткой мышей с нокаутированным геном (КО) RDH12 с помощью AAV8-RDH12-myc и AAV7m8RDH12-myc. Электроретинограммы (ЭРГ) <sup>30</sup> были выполнены на мышах RDH12 /-, которым в один глаз инъецировали исследуемый вектор. Контралатеральный глаз, в который не выполняли инъекцию, использовался как контроль для сравнения защитного эффекта экзогенного RDh12 от светоиндуцированного поражения сетчатки. ЭРГ были выполнены до и после светового поражения для сравнения эффекта. После светового поражения глаза, в которые не <sup>35</sup> выполняли инъекцию, продемонстрировали снижение амплитуд А-волны, тогда как состояние глаз, в которые выполняли инъекцию, осталось относительно стабильным после светового поражения.

На ФИГ. 5А представлен график соотношения А-волн перед засвечиванием и после засвечивания в инъецированной RDH12.myc (AAV8-RDH12-Myc) по сравнению с <sup>40</sup> неинъецированной сетчаткой мышей КО RDH12.

На ФИГ. 5В представлен график соотношения А-волн перед засвечиванием и после засвечивания в инъецированной RDH12.myc (AAV7m8-RDH12-Myc) по сравнению с неинъецированной сетчаткой мышей КО RDH12.

На ФИГ. 6А-6D представлены экспериментальные результаты для одного животного <sup>45</sup> 136, которому в левый глаз (ФИГ. 6А и 6С) не выполняли инъекцию. В правый глаз (ФИГ. 6В и 6D) инъецировали AAV7m8-RDH12-Myc. Была выполнена ЭРГ на исходном уровне с последующим световым поражением, с последующей второй ЭРГ. Животных содержали в течение 10 дней, затем выполняли третью ЭРГ. Мышей умерщвляли,

фиксировали отобранные глаза, выполняли срезы и окрашивали красителем DAPI (ФИГ. 6А и 6В) или родопсином и DAPI (ФИГ. 6С и 6D).

На ФИГ. 7А-7С показано, что архитектура сетчатки сохраняется в сетчатке, инъецированной AAV7m8-RDH12-Мус, по сравнению с неинъецированной сетчаткой 5 после светового поражения. На ФИГ. 7А показан левый неинъецированный глаз. На ФИГ. 7В показано изображение левого глаза при большем увеличении, демонстрирующее тонкий наружный ядерный слой (НЯС) сетчатки. На ФИГ. 1С показан правый глаз, в который инъецировали AAV7m8-RDH12-Мус.

На ФИГ. 8А показана архитектура сетчатки животного, левый глаз которого не 10 был инъецирован, демонстрирующая тонкую сетчатку. На ФИГ. 8В показан правый глаз животного, в который инъецировали AAV8-RDH12-Мус.

На ФИГ. 9А и 9В показана архитектура сетчатки одного животного 147 в изображениях при большем увеличении. На ФИГ. 9А показан неинъецированный левый глаз. На ФИГ. 9В показан правый глаз, в который инъецировали AAV8-RDH12-Мус.

На ФИГ. 10А представлена схематическая карта pAAV.CBAe.h-Native-RDH12, экспрессионной кассеты, которая содержит между 5' ITR и 3'ITR AAV, нативную 15 нуклеотидную последовательность, кодирующую функциональный RDH12 под контролем регуляторных последовательностей, включая промотор CMV.C $\beta$ A (CBAe), направляющих экспрессию RDH12 в выбранной клетке.

На ФИГ. 10В представлена схематическая карта pAAV.CBAe.h-Native-RDH12.myc, экспрессионной кассеты, которая содержит между 5' ITR и 3'ITR AAV, нативную 20 нуклеотидную последовательность, кодирующую функциональный RDH12, связанный с меткой тубе, под контролем регуляторных последовательностей, включая промотор CMV.C $\beta$ A, направляющих экспрессию RDH12 в выбранной клетке.

На ФИГ. 10С представлена схематическая карта pAAV.CBAe.h-cocon opt-RDH12, экспрессионной кассеты, которая содержит между 5' ITR и 3'ITR AAV, кодон- 25 оптимизированную нуклеотидную последовательность, кодирующую функциональный RDH12 (SEQ ID NO: 3), связанный с меткой тубе, под контролем регуляторных последовательностей, включая промотор CMV.C $\beta$ A, направляющих экспрессию RDH12 30 в выбранной клетке.

## ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Способы и композиции, описанные в настоящем документе, пригодны для лечения заболеваний глаз. Такими заболеваниями глаз являются RDH12-опосредованные 35 нарушения или болезни, например нарушения, вызванные или включающие в себя мутацию, дефект или дефицит гена, кодирующего ретинол-дегидрогеназу 12 (RDH12) человека. В одном варианте осуществления эти композиции и способы пригодны для доставки кодон-оптимизированной кДНК, кодирующую функциональный ген ретинол-дегидрогеназы человека (hRDH12), млекопитающим для лечения заболеваний глаз. В некоторых вариантах осуществления RDH12-опосредованное нарушение представляет 40 собой приводящее к слепоте заболевание, такое как ВАЛ или ВАЛ-13, либо ПДС или ПДС-53. В других вариантах осуществления способы и композиции пригодны для редактирования дефектного гена субъекта *in vivo* или для создания подходящей клеточной линии, экспрессирующей кодон-оптимизированную последовательность 45 кДНК, кодирующую функциональный RDH12, с помощью систем редактирования генов, таких как система CRISPR/Cas. Композиции и способы, описанные в настоящем документе, включают в себя экспрессионные кассеты, векторы, рекомбинантные вирусы и другие композиции для доставки одной или множества различных версий последовательности, кодирующую функциональный RDH12. Такие композиции содержат

как оптимизацию кодонов, так и сборку из множества и/или различных версий RDH12 в одной и той же экспрессионной кассете, векторе или вирусе. Эти свойства не только повышают эффективность функционального белка RDH12, который требуется экспрессировать, но и могут также обеспечить более низкую дозу терапевтического реагента, который доставляет функциональный белок, чтобы повысить безопасность.

5 Ожидается, что оптимизация нуклеотидной последовательности, кодирующей RDH12, доставляемой в кассете или вирусе, максимально увеличивает уровень выработки функционального белка RDH12 *in vivo* по сравнению с уровнями, которые могут быть получены с использованием нативной или эндогенной последовательности, кодирующей

10 RDH12.

Технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, которое обычно понимает средний специалист в данной области техники, к которой относится данное изобретение, и используются со ссылкой на опубликованные тексты, которые обеспечивают специалиста в данной области техники общим

15 руководством по многим из терминов, используемых в настоящей заявке. Определения, которые содержатся в настоящем описании, представлены для ясности описания компонентов и композиций в настоящем документе и не предназначены для ограничения заявленного изобретения.

Выражения в единственном числе относятся к одному или более объектам. Например,

20 следует понимать, что термин «экспрессионная кассета» обозначает одну или более таких кассет. Следовательно, форма единственного числа, а также выражения «один или более» и «по меньшей мере один» взаимозаменяются и используются в настоящем документе.

Как используется в настоящем документе термин «около» означает вариабельность

25 плюс или минус 10% от заданной величины, если не указано иное.

Термины «содержит», «содержат» и «содержащий» должны интерпретироваться как включающие, а не исключающие, т.е. такие, которые включают в себя другие неуказанные компоненты или этапы процесса. Термины «состоит», «состоящий» и их

30 варианты должны интерпретироваться как исключающие, а не включающие, т.е. такие, которые исключают компоненты или этапы, которые специально не указаны.

RDH12 - это белок ретинол-дегидрогеназы 12 (полностью транс-/9-цис/11-цис), предпочтительно его человеческий ортолог. Этот белок также известен как RP53, LCA13 и SDR7C2. Как используется в настоящем документе, термин «RDH12» относится к самому полноразмерному белку или его функциональному фрагменту или варианту,

35 как дополнительно описано ниже. В одном варианте осуществления последовательность белка RDH12 получена от того же млекопитающего, для лечения которого предназначена композиция. В одном варианте осуществления RDH12 получен от человека. В другом варианте осуществления RDH12 получен от собаки.

Под термином «фрагмент» или «функциональный фрагмент» применительно к белку

40 понимается любой фрагмент, который сохраняет функцию полноразмерного белка, хотя и необязательно с аналогичным уровнем экспрессии или активности.

Под термином «функциональный белок» понимается любая аминокислотная последовательность, которая демонстрирует биологическую активность нормально функционирующего белка, например RDH12, у субъекта без нарушения или болезни

45 глаз. Такой функциональный белок может нести мутации или модификации в кодирующей его последовательности ДНК или внутри своей аминокислотной последовательности, при этом мутации не будут вызывать болезни или нарушения глаз. В другом варианте осуществления такой функциональный белок может содержать

мутации, которые могут приводить к тому, что белок будет лучше выполнять свои функции, чем «нативная» или эндогенная последовательность. В одном варианте осуществления такой функциональный белок RDH12 может рассматриваться как нормальный или нормально функционирующий белок.

<sup>5</sup> В одном варианте осуществления нативный RDH12 человека имеет следующую последовательность, отмеченную SEQ ID NO: 2 (которая представляет собой кодируемый белок нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1, зарегистрированной в разделе В ниже):

<sup>10</sup> MLVTLGLLTSFFSFLYMVAPSIRKFFAGGVCRTNVQLPGKVVVITGANTGIGKETARELA  
SRGARVYIACRDVLKGESAASEIRVDTKNSQVLVRKLDLSDTKSIRAFAGFLAEKQL  
HILINNAGVMMCPYSKTADGFETHLGVNHLGHFLLTYLLERLKVSAPARVVNVSSVA  
HHIGKIPFHDLQSEKRYSRGFAYCHSKLANVLFTRELAKRLQGTGVTTYAVHPGVVRSE  
<sup>15</sup> LVRHSSLCLLWRLFSPFVKTAREGAQTSLHCALAEGLPLSGKYFSDCKRTWVSPRAR  
NNKTAERLWNVSCELLGIRWE.

<sup>20</sup> В другом варианте осуществления последовательность белка RDH12 представляет собой вариант, который характеризуется по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 78% или по меньшей мере 80% идентичности с нативным белком RDH12, такой как SEQ ID NO: 1. В другом варианте осуществления последовательность белка RDH12 характеризуется по меньшей мере 85% идентичности с нативным белком RDH12. В другом варианте осуществления последовательность белка RDH12 характеризуется по меньшей мере 90% идентичности с нативным белком RDH12. В другом варианте осуществления последовательность белка RDH12 характеризуется по <sup>25</sup> меньшей мере 91% идентичности с нативным белком RDH12. В другом варианте осуществления последовательность белка RDH12 характеризуется по меньшей мере 92% идентичности с нативным белком RDH12. В другом варианте осуществления последовательность белка RDH12 характеризуется по меньшей мере 93% идентичности с нативным белком RDH12. В другом варианте осуществления последовательность белка RDH12 характеризуется по меньшей мере 94% идентичности с нативным белком RDH12. В другом варианте осуществления последовательность белка RDH12 характеризуется по меньшей мере 95% идентичности с нативным белком RDH12. В <sup>30</sup> другом варианте осуществления последовательность белка RDH12 характеризуется по меньшей мере 96% идентичности с нативным белком RDH12. В другом варианте осуществления последовательность белка RDH12 характеризуется по меньшей мере 97% идентичности с нативным белком RDH12. В другом варианте осуществления последовательность белка RDH12 характеризуется по меньшей мере 98% идентичности с нативным белком RDH12. В другом варианте осуществления последовательность белка RDH12 характеризуется по меньшей мере 99% идентичности с нативным белком RDH12.

<sup>40</sup> Термины «процент (%) идентичности», «идентичность последовательности», «процент идентичности последовательности» или «на процентов идентичная» в контексте аминокислотных последовательностей относится к остаткам в двух последовательностях, которые являются аналогичными при выравнивании на совпадение. Процент идентичности можно легко определить для аминокислотных <sup>45</sup> последовательностей по всей длине белка, полипептида, от около 70 аминокислот до около 300 аминокислот, или для их пептидного фрагмента, или кодирующих последовательностей соответствующих нуклеотидных последовательностей. Длина

подходящего аминокислотного фрагмента может составлять по меньшей мере 8 аминокислот и может быть до около 150 аминокислот. Как правило, когда речь идет об «идентичности», «гомологии» или «сходстве» между двумя различными последовательностями, «идентичность», «гомология» или «сходство» определяются по отношению к «выровненным» последовательностям. «Выровненные» последовательности или «выравнивания» относятся к множеству нуклеотидных последовательностей или белковых (аминокислотных) последовательностей, часто содержащих коррекции для отсутствующих или дополнительных оснований или аминокислот по сравнению с эталонной последовательностью. Выравнивания выполняются с помощью любой из разнообразных общедоступных или коммерчески доступных программ для множественного выравнивания последовательностей. Программы выравнивания последовательностей доступны для аминокислотных последовательностей, например программы Clustal X, MAP, PIMA, MSA, BLOCKMAKER, MEME и Match-Box. Как правило, любая из этих программ используется с настройками по умолчанию, хотя специалист в данной области техники может при необходимости менять эти настройки. Альтернативно, специалист в данной области техники может использовать другой метод, который обеспечивает по меньшей мере такой же уровень идентичности или выравнивания, что и указанные методы. См., например, J.D. Thomson et al, Nucl. Acids. Res., "A comprehensive comparison of multiple sequence alignments", 27(13) :2682-2690 (1999).

Под терминами «оптимизированный» или «кодон-оптимизированный» белок RDH12 понимают последовательность белка RDH12, кодируемую последовательностью ДНК, которая отличается от нативной или встречающейся в природе последовательности, такой как SEQ ID NO: 1, изменениями кодонов, которые приводят к молчащим, консервативным или неконсервативным аминокислотным изменениям, либо аминокислотным вставкам или делециям в белке. Эти изменения могут повысить выработку белка и/или улучшить подтверждение и стабильность белка. Оптимизированный белок RDH12, как описано в настоящем документе, представляет собой функциональный белок RDH12, кодируемый кодон-оптимизированной последовательностью ДНК.

В одном варианте осуществления оптимизированный белок RDH12 представляет собой транслированную последовательность функционального белка RDH12, отмеченную SEQ ID NO: 4 (которая представляет собой кодируемый белок нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 3, зарегистрированной в разделе В ниже):

AAATMLVTLGLLTSFFSFLYMVAPSIRKFFAGGVCRTNVQLPGKVVVITGANTGIGKET  
ARELASRGARVYIACRDVLKGESAASEIRVDTKNSQVLVRKLDSLTKSIRAFAGFLAE  
EKQLHILINNAGVMMCPSKTADGFETHLGVNHLGHFLTYLLERLKVSAPARVVNV  
SSVAHHIGKIPFHDLQSEKRYSRGFAYCHSKLANVLFTRELAKRLQGTGVTTYAVHPGV  
VRSELVRHSSLCLLWRLFSPFVKTAREGAQTSLHCALAEGLPESGKYFSDCKRTWVS  
PRARNNKTAERLWNVSCELLGIRWE.

Как указано выше, синонимичные изменения кодонов или изменения кодонов, приводящие к консервативным аминокислотным изменениям, или вставкам, или делециям, могут повысить выработку белка и/или улучшить подтверждение и стабильность белка. Такая оптимизация используется для разработки терапевтических реагентов, которые максимально повышают уровень выработки экспериментального белка по сравнению с уровнями, которые можно получить с помощью эндогенной или

нативной последовательности.

Нуклеотидная последовательность, кодирующая нормальный или нормально функционирующий белок RDH12, может быть получена от любого млекопитающего, которое нативно экспрессирует белок RDH12 или его гомолог. В одном варианте 5 осуществления нативная нуклеотидная последовательность, кодирующая человеческий RDHT2, зарегистрирована в базе данных NCBI под учетным номером NC\_000014.9.

В одном варианте осуществления нативная последовательность ДНК RDH12 человека отмечена SEQ ID NO: 1:

```

ATGCTGGTCACCTGGGACTGCTCACCTCCTCTCGTCTGTATATGGTAGCTC
10 CATCCATCAGGAAGTTCTTGCTGGTGGAGTGTGTAGAACAAATGTGCAGCTCCTG
GCAAGGTAGTGGTGTCACTGGCGCCAACACGGGCATTGGCAAGGAGACGGCCAGA
GAGCTCGCTAGCCGAGGGAGCCCAGTCTATATTGCCTGCAGAGATGTACTGAAGGG
GGAGTCTGCCAGTGAAATCCGAGTGGATACAAAGAACTCCCAGGTGCTGGTGC
15 GGAAATTGGACCTATCCGACACCAAATCTATCCGAGCCTTGCTGAGGGCTTCTGG
CAGAGGAAAAGCAGCTCCATATTCTGATCAACAATGCCGGAGTAATGATGTGTCCA
TATTCCAAGACAGCTGATGGCTTGAAACCCACCTGGGAGTCAACCACCTGGGCCAC
20 TTCCTCCTCACCTACCTGCTCCTGGAGCGGCTAAAGGTGTCTGCCCTGCACGGGTG
GTTAATGTGTCCTCGGTGGCTCACCACATTGGCAAGATTCCCTCCACGACCTCCAG
AGCGAGAAGCGCTACAGCAGGGTTTGCCTATTGCCACAGCAAGCTGGCCAATGT
GCTTTTACTCGTGAGCTGGCCAAGAGGCTCCAAGGCACCGGGGTACCCACCTACGC
25 AGTGCACCCAGGCGTCGTCCGCTCTGAGCTGGTCCGGCACTCCTCCCTGCTTGCCT
GCTCTGGCGGCTTTCTCCCCCTTGTCAGACGGCACGGGAGGGGGCGCAGACCA
GCCTGCACTGCGCCCTGGCTGAGGGCCTGGAGCCCTGAGTGGCAAGTACTTCAGTG
ACTGCAAGAGGACCTGGGTGTCTCCAAGGGCCCGAAATAACAAAACAGCTGAGCGC
30 CTATGGAATGTCAGCTGTGAGCTTAGGAATCCGGTGGGAGT

```

В других вариантах осуществления в последовательность, кодирующую RDH12, вносят определенные модификации, чтобы повысить экспрессию в клетке-мишени. К таким модификациям относится кодон-оптимизация (см., например, патенты США №№7561972; 7561973 и 7888112, включенные в настоящий документ посредством ссылки) 35 и конверсия последовательности, окружающей сайт начала трансляции, в консенсусную последовательность Козак: gccRccATGR. См. Kozak et al, Nucleic Acids Res. 15 (20): 8125-8148, включенную в настоящий документ посредством ссылки. Кодон-оптимизированная нуклеотидная последовательность отличается от нативной или встречающейся в природе последовательности, такой как последовательность SEQ ID NO: 1, синонимичными 40 изменениями кодонов, которые повышают выработку белка, экспрессию белка и/или улучшают подтверждение и стабильность белка.

Кодон-оптимизированные кодирующие участки могут быть разработаны с помощью различных методов. Такая оптимизация может быть выполнена с помощью методов, которые доступны онлайн, опубликованных методов или компаний, которая 45 предоставляет услуги кодон-оптимизации. Один метод кодон-оптимизации описан, например, в публикации международной заявки на патент № WO 2015/012924, которая включена в настоящий документ посредством ссылки. Вкратце, нуклеотидную последовательность, кодирующую продукт, модифицируют синонимичными

последовательностями кодонов. Соответствующим образом, модифицируется вся длина открытой рамки считывания (ОРС) для продукта. Однако в некоторых вариантах осуществления может быть изменен только фрагмент ОРС. Используя один из этих методов, к любой заданной полипептидной последовательности можно применить

- 5 значения встречаемости и получить нуклеотидный фрагмент кодон-оптимизированного кодирующего участка, который кодирует этот полипептид. Такая оптимизация используется для разработки реагентов генной терапии, которые максимально повышают уровень выработки экспериментального белка по сравнению с уровнями, которые можно получить с помощью эндогенной или нативной последовательности.
- 10 Такие кодон-оптимизированные последовательности могут в одном варианте осуществления повышать эффективность получаемых в результате композиций терапевтических реагентов, но могут также позволять использование более низкой дозы реагента, повышая, таким образом, терапевтическую безопасность.

Доступен ряд опций для выполнения фактических изменений кодонов или для

- 15 синтезирования кодон-оптимизированных кодирующих участков, разработанных в соответствии с тем, как описано в настоящем документе. Такие модификации или синтез могут осуществляться с помощью стандартных и обычных операций молекулярной биологии, хорошо известных специалистам в данной области техники. В одном подходе с помощью стандартных методов синтезируют серию комплементарных
- 20 олигонуклеотидных пар, каждая из которых имеет 80-90 нуклеотидов в длину и охватывает длину требуемой последовательности. Эти олигонуклеотидные пары синтезируют таким образом, что при ренатурации они образуют двухцепочечные фрагменты из 80-90 пар оснований, содержащих «липкие» концы, например, каждый олигонуклеотид в паре синтезируется с возможностью расширения на 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9,
- 25 10 или более оснований за пределы участка, который является комплементарным другому олигонуклеотиду в паре. Одноцепочечные концы каждой пары олигонуклеотидов разработаны с возможностью ренатурации с одноцепочечным концом другой пары олигонуклеотидов. Олигонуклеотидным парам позволяют ренатурироваться, и затем приблизительно пяти или шести из этих двухцепочечных
- 30 фрагментов позволяют совместно ренатурироваться посредством «липких» одноцепочечных концов, затем они совместно лигируются и клонируются в стандартный бактериальный клонирующий вектор, например вектор TOPO®, доступный от Invitrogen Corporation, г. Карлсbad, штат Калифорния, США. После этого конструкцию секвенируют с помощью стандартных методов. Несколько из этих конструкций,
- 35 содержащих 5-6 фрагментов из совместно лигированных фрагментов размером 80-90 пар оснований, т.е. фрагменты из около 500 пар оснований, получают таким образом, что вся требуемая последовательность представлена сериями плазмидных конструкций. Вставки этих плазмид затем разрезаются с помощью соответствующих рестрикционных ферментов и совместно лигируются для образования конечной конструкции. Конечную
- 40 конструкцию затем клонируют в стандартный бактериальный клонирующий вектор и секвенируют. Дополнительные методы будут очевидны специалисту в данной области техники. Кроме того, коммерчески доступным является синтез генов.

В одном варианте осуществления кодон-оптимизированная последовательность ДНК RDH12 представляет собой последовательность ДНК RDH12, отмеченную SEQ ID NO: 3.

GCGGCCGCCACCATGTTGGTCACCCTCGGACTCCTTACCTCATTTCCTCCCTGT  
 ACATGGTCGCCCGAGCATTAGAAAGTTCTCGCCGGAGTGTGTAGGACTAAC  
 GTGCAGTTGCCGGAAAGGTCGTGGTATTACTGGCGCCAACACTGGTATCGGAAA  
 5 GGAAACTGCGCGGGAACTGGCGTCCAGAGGTGCCCGCGTGTACATTGCATGCCGCG  
 ACGTGCTGAAGGGAGAATCCGCCGCGTCCGAGATCCGGGTGGACACCAAAAATAGC  
 CAGGTGCTCGTGCAGAAGCTGGATCTGTCCGACACCAAGTCAATCAGGGCCTTGCC  
 GAGGGGTTCTGGCTGAAGAGAAGCAGCTCACATTCTGATCAACAAACGCCGGGT  
 10 CATGATGTGCCCTACTCAAAGACCGCAGACGGCTCGAAACCCACCTGGCGTGA  
 ACCATCTGGGACACTCCTGCTGACCTATCTGCTGCTGGAGCGACTGAAAGTGTGCG  
 CTCCTGCTCGGGCGTGAACGTGTCCAGCGTGGCCCACATCACATCGGAAAGATCCCAT  
 15 TCCACGATCTCCAATCCGAGAAGCGGTACAGCAGGGCTCGCGTACTGTCACTCGA  
 AGTTGGCCAACGTGCTTTACCCCGAAGCTGGCCAAGCGGCTGCAGGGCACTGGC  
 GTGACCACTTACGCCGTGCACCCCTGGTGTGCGGTCCGAGCTGGTCCGCCATTCC  
 TCTCTTCTGTGCCTCCTGTGGAGACTCTTCTCCCCGTTCGTCAAGACCGCAAGGGAA  
 20 GGAGCCCCAACGAGCCTTCACTGTGCCCTGGCGGAAGGACTGGAGCCGCTTAGCGG  
 AAAGTACTTCTCGGACTGCAAGCGCACCTGGGTGCGCCTAGAGCTCGGAACAACA  
 AGACTGCCGAACGCCCTGGAATGTGTCCTGCGAGCTGCTGGGAATCAGATGGGAG  
 TGATGATCATGAGATCT

25 При выравнивании с нативной нуклеотидной последовательностью, кодирующей RDH12 человека, кодон-оптимизированная последовательность, кодирующая RDH12, может иметь процент идентичности по меньшей мере 50%, или по меньшей мере 60%, или по меньшей мере 70%, или по меньшей мере 80%, или по меньшей мере 90%, включая любое целое число в любом из этих диапазонов. В одном варианте осуществления кодон-оптимизированный RDH12 имеет процент идентичности с нативной последовательностью по меньшей мере 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%.

35 Термины «процент (%) идентичности», «идентичность последовательности», «процент идентичности последовательности» или «на процентов идентичная» в контексте нуклеотидных последовательностей относится к основаниям в двух последовательностях, которые являются аналогичными при выравнивании на совпадение. Процент идентичности определяется путем сравнения двух последовательностей, выровненных при оптимальных условиях, относительно последовательностей, которые подлежат сравнению. Сравнение идентичности последовательностей может выполняться по всей длине последовательности, кодирующей RDH12, или по фрагменту из по меньшей мере около 100-150 нуклеотидов, или произвольно. Однако также может быть необходима идентичность между более мелкими фрагментами, например из по меньшей мере девяти нуклеотидов, как правило, из по меньшей мере около 20-24 нуклеотидов, из по меньшей мере около 28-32 нуклеотидов, из по меньшей мере около 36 или более нуклеотидов. Многочисленные программы выравнивания последовательностей также доступны для нуклеотидных последовательностей. К примерам таких программ относится Clustal W, CAP Sequence Assembly, BLAST, MAP и MEME, доступ к которым можно получить через веб-серверы

в интернете. Специалистам в данной области техники известны другие источники подобных программ. Альтернативно, также применяются утилиты Vector NTI. В данной области техники также известен ряд методов, которые могут использоваться для измерения идентичности нуклеотидных последовательностей, включая те методы,

5 которые входят в описанные выше программы. В качестве другого примера, полинуклеотидные последовательности могут сравниваться с помощью Fasta<sup>TM</sup> - программы в GCG версии 6.1. Также может использоваться общедоступное программное обеспечение для анализа последовательностей, более конкретно, BLAST или аналитические инструменты, которые обеспечиваются общедоступными базами данных.

10 В варианте осуществления SEQ ID NO: 3 авторы изобретения модифицировали кДНК нативного RDH12 человека, добавив полный консенсус Козак на 5' конце, помещенном в сайт NotI, и добавив сайты Bell и BamHI на 3' конце (сайты рестрикции для клонирования). Стоп-кодон TGA помещали в сайт Bell для обеспечения оптимальной эпитопной маркировки. В этом варианте осуществления также избегают использования 15 определенных рестрикционных ферментов, таких как BglII, Bsu36I, NheI, NotI, SacI и XbaI. Сайт рестрикции NotI с последовательностью Козак-САСС вставляют в нуклеотид 1-12 SEQ ID NO: 3. Сайт рестрикции BglII вставляют в последние шесть нуклеотидов SEQ ID NO:3.

15 Конкретно, на ФИГ. 1А-1В показано выравнивание последовательности SEQ ID NO: 3 (кодон-оптимизированная последовательность ДНК RDH12) с SEQ ID NO: 1 (нативная последовательность, кодирующая RDH12). Открытая рамка считывания кодон-оптимизированного RDH12 отличается от нативной последовательности на 22% нуклеотидов (т.е. 78%-ная гомология), хотя полученный в результате кодируемый белок является аналогичным.

20 Как используется в настоящем документе, термин «субъект» означает млекопитающее, включая человека, животное или сельскохозяйственное животное, домашнее животное, а также животных, которые обычно используются в клинических исследованиях. В одном варианте осуществления субъектом данных способов и композиций является человек. К другим подходящим субъектам относятся, помимо прочего, грызуны, крысы, псовые, кошачьи, свиньи, крупный рогатый скот, овцы и другие. Как используется в настоящем документе, термин «субъект» используется взаимозаменяющими с термином «пациент». К субъекту относится любое млекопитающее, нуждающееся в данных способах лечения или профилактики, включая, в особенности, человека. Субъект может быть мужского или женского пола. В одном варианте 25 осуществления субъект страдает от врожденного амавроза Лебера (ВАЛ) или пигментной дегенерации сетчатки или находится в группе риска развития этих заболеваний. В другом варианте осуществления субъект страдает от ВАЛ, ПДС или другого заболевания глаз, связанного с мутацией, отсутствием или неадекватной экспрессией функционального RDH12, или находится в группе риска развития таких 30 заболеваний. В другом варианте осуществления субъект продемонстрировал клинические симптомы ВАЛ или ПДС. К клиническим симптомам ВАЛ или ПДС относятся, помимо прочего, нистагм, ухудшение периферического зрения, ухудшение центрального зрения (при чтении), ухудшение ночного зрения, потеря восприятия цвета, снижение остроты зрения, ухудшение функции фоторецепторов, изменения пигментации и слепота. В 35 другом варианте осуществления у субъекта диагностировали ВАЛ или ПДС. В еще одном варианте осуществления субъект еще не продемонстрировал клинические симптомы ВАЛ или ПДС.

40 В еще одном варианте осуществления субъект демонстрирует приблизительно или

- по меньшей мере 5-10% повреждение и/или потерю фоторецепторов. В другом варианте осуществления субъект демонстрирует по меньшей мере 20% повреждение и/или потерю фоторецепторов. В другом варианте осуществления субъект демонстрирует по меньшей мере 30% повреждение и/или потерю фоторецепторов. В другом варианте осуществления субъект демонстрирует по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60% повреждение/потерю фоторецепторов. В другом варианте осуществления субъект демонстрирует по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% повреждение и/или потерю фоторецепторов. В еще одном варианте осуществления субъект демонстрирует приблизительно или по меньшей мере 5-10% или более 10 ухудшение/потерю функции палочек и/или колбочек. В еще одном варианте осуществления субъект демонстрирует по меньшей мере 20% ухудшение/потерю функции палочек и/или колбочек. В еще одном варианте осуществления субъект демонстрирует по меньшей мере 30% ухудшение/потерю функции палочек и/или колбочек. В еще одном варианте осуществления субъект демонстрирует по меньшей мере 40% ухудшение/потерю функции палочек и/или колбочек. 15 20 25 30 35 40

Как используется в настоящем документе, термин «нарушение», «генетическое нарушение» или «RDH12-опосредованное нарушение» используется в настоящем описании для обозначения любых болезней, нарушений или состояний, связанных со вставкой, изменением или делецией в аминокислотной последовательности нативного (например, дикого типа) белка RDH12, которые делают белок RDH12 частично или полностью нефункциональным в глазных клетках субъекта. Нарушение или генетическое заболевание также могут включать в себя какой-либо другой дефект, который делает белок RDH12 частично или полностью нефункциональным, либо частично или полностью экспрессируемым в глазных клетках субъекта. Если не указано иное, такие нарушения включают в себя наследственные и/или ненаследственные генетические нарушения, а также заболевания и состояния, при которых физические симптомы могут не проявляться в младенческом или детском возрасте.

Как используется в настоящем документе, термин «глазные клетки» относится к любой клетке глаза или клетке, связанной с функцией глаза. Термин может относиться к одной или более фоторецепторных клеток, включая палочки, колбочки и светочувствительные ганглионарные клетки, клетки пигментного эпителия сетчатки (ПЭС), клетки Мюллера, биполярных клеток, горизонтальных клеток, амакриновых клеток. В одном варианте осуществления глазные клетки представляют собой фоторецепторные клетки. В другом варианте осуществления глазные клетки представляют собой клетки палочек и колбочек. В еще одном варианте осуществления глазные клетки представляют собой клетки колбочек.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения субъект страдает от «заболевания глаз», для лечения которого были разработаны компоненты, композиции и способы настоящего изобретения. Как используется в настоящем документе, к «заболеванию глаз» относятся колбочно-палочковые дистрофии и заболевания сетчатки, включая, помимо прочего, болезнь Штаргардта (аутосомно-доминантная или аутосомно-рецессивная), пигментную дегенерацию сетчатки, возрастную макулярную дегенерацию, колбочно-палочковую дистрофию, врожденный

амавроз Лебера, синдром Ашера, синдром Барде-Бидля, болезнь Беста, синдром Бассена-Корнцвейга, ретиношизис, нелеченное отслоение сетчатки, узорчатую дистрофию, ахроматопсию, хороидеремию, глазной альбинизм, синдром увеличения S-колбочек, диабетическую ретинопатию, ретинопатию недоношенных, серповидно-клеточную

- 5 ретинопатию, болезнь Рефсума, врожденную стационарную ночную слепоту, глаукому, гиаратную атрофию или окклюзию вены сетчатки. В другом варианте осуществления субъект страдает от глаукомы, наследственной оптической нейропатии Лебера, лизосомальной болезни накопления или пероксисомной патологии либо находится в группе риска развития этих заболеваний. К клиническим симптомам таких болезней
- 10 глаз относится, помимо прочего, ухудшение периферического зрения, ухудшение центрального зрения (при чтении), ухудшение ночного зрения, потеря восприятия цвета, снижение остроты зрения, ухудшение функции фоторецепторов, изменения пигментации и в конечном итоге слепота.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нуклеотидная

- 15 последовательность RDH12 доставляется в нуждающиеся в лечении глазные клетки при помощи вектора или вирусного вектора, многие из которых известны и доступны в данной области техники. Для доставки в глазные клетки терапевтический вектор предпочтительно является нетоксичным, неиммуногенным, легким в получении и эффективным для защиты и доставки ДНК в клетки-мишени. Как используется в
- 20 настоящем документе, «вектор» представляет собой молекулу нукleinовой кислоты, в которую может быть вставлена экзогенная, или гетерологичная, или искусственно созданная нуклеотидная последовательность или трансген, которые затем могут быть введены в соответствующую клетку-хозяина. Векторы предпочтительно имеют одну или более точек начала репликации, а также один или более сайтов, в которые может
- 25 быть вставлена рекомбинантная ДНК. Векторы часто обладают удобными средствами, с помощью которых можно выбрать клетки с векторами среди клеток без векторов, например, они кодируют гены лекарственной устойчивости. К распространенным векторам относятся плазмиды, вирусные геномы и (преимущественно у дрожжей и бактерий) «искусственные хромосомы».

- 30 Термин «экзогенный», когда он используется для описания нуклеотидной последовательности или белка, означает, что нукleinовая кислота или белок не встречаются естественным образом в том положении, в котором они существуют в хромосоме, рекомбинантной плазмиде, векторе или клетке-хозяине. Экзогенная нуклеотидная последовательность также относится к последовательности, которая
- 35 была получена и введена в одну и ту же клетку-хозяина или организм субъекта, однако которая присутствует в неестественном состоянии, например, с другим числом копий или под контролем других регуляторных элементов.

- Термин «гетерологичный», когда он используется для описания нуклеотидной последовательности или белка, означает, что нукleinовая кислота или белок были
- 40 получены из другого организма или от другого вида этого же организма, отличных от клетки-хозяина или субъекта, в которых они экспрессируются. Термин «гетерологичный», когда он используется по отношению к белку или нукleinовой кислоте в плазмиде, экспрессионной кассете или векторе, означает, что белок или нукleinовая кислота присутствуют с другой последовательностью или
- 45 подпоследовательностью, с которыми рассматриваемые белок или нукleinовая кислота не встречаются в природе в такой же взаимосвязи относительно друг друга.

Термин «выделенный» означает, что материал был удален из своей исходной среды (например, естественной среды, если он встречается в природе). Например,

встречающийся в природе полинуклеотид или полипептид, присутствующий в живом существе, не является выделенным, однако этот же полинуклеотид или полипептид, отделенный от некоторых или всех существующих материалов в естественной системе, будет выделенным, даже если впоследствии он будет повторно введен в эту естественную систему. Такие полинуклеотиды могут быть частью вектора и/или такие полинуклеотиды или полипептиды могут быть частью композиции, и все равно будут выделяться в том отношении, что такой вектор или композиция не являются частью их естественной среды.

Под термином «искусственно созданный» понимается, что нуклеотидные

последовательности, кодирующие белки RDH12 и RDH12, описанные в настоящем документе, собираются и помещаются в любой подходящий генетический элемент, например «голую ДНК», фаг, транспозон, космиду, эпизому и т.д., который переносит размещенные на нем последовательности RDH12 в клетку-хозяина, например, для получения невирусных систем доставки (например, систем на основе РНК, «голой ДНК» или т.п.) или для получения вирусных векторов в упаковывающей клетке-хозяине и/или для доставки в хозяйские клетки субъекта. В одном варианте осуществления генетический элемент представляет собой плазмиду. Способы, которые используются для получения таких искусственно созданных конструкций, известны специалистам в области манипуляций с нуклеиновыми кислотами и включают в себя генную инженерию, рекомбинантную инженерию и синтетические методики. См., например, Green and Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (2012).

«Вирусные векторы» определяются как дефектные по репликации, синтетические или рекомбинантные вирусные частицы, содержащие экзогенную или гетерологичную нуклеотидную последовательность, кодирующую функциональный RDH12. В одном варианте осуществления экспрессионная кассета, как описано в настоящем документе, может быть искусственно создана на основе плазмида, которая используется для доставки лекарств или для получения вирусного вектора. Подходящие вирусные векторы предпочтительно являются дефектными по репликации и выбираются среди таких, которые нацеливаются на глазные клетки. В одном варианте осуществления экспрессионная кассета, содержащая трансген, упаковывается в вирусный капсид или оболочку. Любые вирусные геномные последовательности, которые также упаковываются в этот вирусный капсид или оболочку, являются дефектными по репликации, т.е. они не могут создавать потомство вирионы, однако сохраняют способность инфицировать клетки-мишени. В одном варианте осуществления геном вирусного вектора не содержит гены, кодирующие ферменты, необходимые для репликации (геном может быть искусственно создан «выпотрошенным» - содержащим только представляющий интерес трансген, flankированный сигналами, необходимыми для амплификации и упаковки искусственного генома), однако эти гены могут поставляться в ходе продуцирования. Таким образом, он считается безопасным для использования в генной терапии, поскольку репликация потомства вирионов и инфицирование ими не могут происходить иным образом, кроме как в присутствии вирусного фермента, необходимого для репликации.

Вирусные векторы могут содержать любой вирус, пригодный для генной терапии, включая, помимо прочего, адено-вирус; вирус герпеса; лентивирус; ретровирус; парвовирус и т.д. Однако для облегчения понимания в настоящем документе в качестве примера вирусного вектора приводится адено-ассоциированный вирус. Таким образом, в одном варианте осуществления терапевтическая композиция или реагент содержит

вектор на основе адено-ассоциированного вируса, содержащий трансген RDH12, функционально соединенный с регулирующими экспрессию последовательностями. Как используется в настоящем документе, термин «транген» означает экзогенную или искусственно созданную нуклеотидную последовательность, кодирующую белок,

5 которая находится под контролем промоторной или регулирующей экспрессию последовательности в экспрессионной кассете (с фланкированием ITR гAAV или без него), рекомбинантной плазмиде или провирусной плазмиде, векторе или клетке-хозяине, описанных в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления трансген представляет собой кодон-оптимизированную последовательность, кодирующую

10 RDH12, SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления трансген представляет собой встречающуюся в природе или нативную последовательность, кодирующую RDH12, SEQ ID NO: 1. В других вариантах осуществления как кодон-оптимизированные, так и встречающиеся в природе последовательности, кодирующие RDH12, в различных комбинациях могут служить в качестве трансгена.

15 Как используется в настоящем документе, термины «функционально соединен» или «функционально связан» относятся к регулирующим экспрессию последовательностям, которые являются смежными с нуклеотидной последовательностью, кодирующей RDH12, и/или регулирующим экспрессию последовательностям, которые действуют в виде трансфакторов или дистанционно для контроля ее транскрипции и экспрессии.

20 Как используется в настоящем документе, термин «клетка-хозяин» может относиться к линии упаковывающих клеток, в которой рекомбинантный AAV вырабатывается из провирусной плазмиды. В качестве альтернативы, термин «клетка-хозяин» может относиться к любой клетке-мишени, в которой требуется экспрессия трансгена. Таким образом, «клетка-хозяин» относится к прокариотической или эукариотической клетке,

25 которая содержит экзогенную или гетерологичную ДНК, которая была введена в клетку любым способом, например электропорацией, осаждением фосфатом кальция, микроинъекцией, трансформацией, вирусной инфекцией, трансфекцией, липосомной доставкой, с помощью методик слияния мембранны, с помощью вводимых с высокой скоростью покрытых ДНК гранул, вирусной инфекцией и слиянием протопластов. В

30 некоторых вариантах осуществления настоящего документа термин «клетка-хозяин» относится к культурам глазных клеток различных видов млекопитающих для проведения оценки *in vitro* композиций, описанных в настоящем документе. В других вариантах осуществления настоящего документа термин «клетка-хозяин» относится к клеткам, используемым для получения и упаковки вирусного вектора или рекомбинантного

35 вируса. В других вариантах осуществления термин «клетка-хозяин» предназначен для обозначения глазных клеток субъекта, получающего лечение *in vivo* болезни глаз. В еще одном варианте осуществления клетка-хозяин может относиться к индуцированным плюрипотентным стволовым клеткам (иПСК), которые являются зрелыми клетками, генетически перепрограммированными в состояние наподобие эмбриональных

40 стволовых клеток путем принудительной экспрессии генов и факторов, важных для поддержания характерных свойств эмбриональных стволовых клеток. Такие клетки могут подвергаться манипуляции и использоваться в качестве моделей или инструментов для оценки функции векторов, описанных в настоящем документе.

«Плазмиды» или плазмидные векторы, как правило, обозначаются в настоящем 45 документе строчной буквой р, перед и/или после которой следуют заглавные буквы и/ или цифры, в соответствии со стандартными соглашениями по именованию, которые известны специалистам в данной области техники. Исходные плазмиды, описанные в настоящем документе, являются коммерчески доступными, общедоступными на

неограниченной основе или могут быть сконструированы из доступных плазмид путем применения хорошо известных опубликованных процедур. Многие плазмиды и другие клонирующие векторы и векторы экспрессии, которые могут использоваться в соответствии с настоящим изобретением, хорошо известны и легко доступны

5 специалистам в данной области техники. Более того, специалисты в данной области техники смогут легко сконструировать любое количество других плазмид, пригодных для использования в настоящем изобретении. Свойства, конструкция и применение подобных плазмид, а также других векторов, в настоящем изобретении будут очевидны специалистам в данной области техники из настоящего описания.

10 Как используется в настоящем документе, термины «транскрипционная регулирующая последовательность» или «регулирующая экспрессию последовательность» относятся к нуклеотидным последовательностям, таким как инициирующие последовательности, энхансерные последовательности и промоторные последовательности, которые индуцируют, репрессируют или любым другим образом 15 контролируют транскрипцию нуклеотидных последовательностей, кодирующих белок, с которыми они функционально соединены.

В еще одном дополнительном варианте осуществления предлагается вектор на основе рекомбинантного адено-ассоциированного вируса (AAV) для доставки конструкций RDH12 и оптимизированных последовательностей, описанных в настоящем документе.

20 Как используется в настоящем документе, термин «AAV» относится к десяткам встречающихся в природе и доступных адено-ассоциированных вирусов, а также к искусственным AAV. Вирусный вектор на основе адено-ассоциированного вируса (AAV) представляет собой резистентную к ДНКазе частицу AAV, имеющую капсид белка AAV, в который упакованы нуклеотидные последовательности для доставки в клетки-мишени. Капсид AAV состоит из 60 капсидных (сар) белковых субъединиц, VP1, VP2 и 25 VP3, которые расположены с икосаэдрической симметрией в соотношении приблизительно от 1:1:10 до 1:1:20 в зависимости от выбранного AAV. AAV могут быть выбраны в качестве источника капсидов вирусных векторов AAV, как указано выше. См., например, опубликованную заявку на патент США №2007-0036760-A1; 30 опубликованную заявку на патент США №2009-0197338-A1; ЕР 1310571. См. также, WO 2003/042397 (AAV7 и другие AAV обезьян), патент США 7790449 и патент США 7282199 (AAV8), WO 2005/033321 и US 7906111 (AAV9), и WO 2006/110689, и WO 2003/042397 (rh.10). Эти документы также описывают другие AAV, которые могут быть выбраны для получения AAV, и включены посредством ссылки.

35 Среди AAV, выделенных у человека или нечеловекообразных обезьян (НЧО) или искусственно созданных и хорошо описанных, AAV2 человека является первым AAV, который был создан как вектор для переноса генов; он широко используется для проведения эффективных экспериментов по переносу генов в различных тканях-мишенях и животных моделях. Если не указано иное, капсид AAV, ITR и другие выбранные 40 компоненты AAV, описанные в настоящем документе, могут быть легко выбраны из любых AAV, включая, помимо прочего, AAV, обычно обозначаемые как AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV8bp, AAV7M8 и AAVAnc80, вариантов любых известных или упомянутых AAV или AAV, которые могут быть открыты, или их смесей. См., например, WO 2005/033321, который включен в настоящий 45 документ посредством ссылки.

В другом варианте осуществления капсид AAV представляет собой капсид AAV8bp, который предпочтительно нацелен на биполярные клетки. См. WO 2014/024282, который включен в настоящий документ посредством ссылки. В другом варианте осуществления

капсид AAV представляет собой капсид AAV7m8, который продемонстрировал предпочтительную доставку в наружный слой сетчатки. См. Dalkara et al, In Vivo-Directed Evolution of a New Adeno-Associated Vims for Therapeutic Outer Retinal Gene Delivery from the Vitreous, Sci Transl Med 5, 189ra76 (2013), который включен в настоящий документ

5 посредством ссылки. В одном варианте осуществления капсид AAV представляет собой капсид AAV8. В другом варианте осуществления капсид AAV представляет собой капсид AAV9. В другом варианте осуществления капсид AAV представляет собой капсид AAV5.

В некоторых вариантах осуществления капсид AAV для использования в вирусном 10 векторе может быть получен путем мутагенеза {т.е. путем вставок, делеций или замен} одного из упомянутых выше капсидов AAV или кодирующей его нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления капсид AAV является химерным, содержащим домены из двух, или трех, или четырех, или более из упомянутых выше капсидных белков AAV. В некоторых вариантах осуществления капсид AAV представляет собой 15 мозаику из мономеров Vp1, Vp2 и Vp3 от двух или трех различных AAV или рекомбинантных AAV. В некоторых вариантах осуществления композиция гAAV содержит более одного из упомянутых выше Cap. В одном варианте осуществления желательно использовать капсид AAV, который демонстрирует тропизм по отношению 20 к требуемой клетке-мишени, например фоторецепторам, ПЭС или другим глазным клеткам. В одном варианте осуществления капсид AAV представляет собой тирозиновый капсид-мутант, в котором некоторые находящиеся на поверхности тирозиновые остатки замещаются фенилаланином (F).

Такие варианты AAV описаны, например, у Mowat et al, Jan 2014, Tyrosine capsid-mutant AAV vectors for gene delivery to the canine retina from a subretinal or intravitreal approach, 25 Gene Therapy 21, 96-105, который включен в настоящий документ посредством ссылки. В одном варианте осуществления капсид представляет собой капсид AAV8 с мутацией Y733F. В другом варианте осуществления капсид представляет собой капсид AAV8 с мутациями Y447F, Y733F и T494V (также называемый AAV8(C&G+T494V) и rep2-cap8 (Y447F+733F+T494V)), как описано у Kay et al, Apr 2013, Targeting Photoreceptors via 30 Intravitreal Delivery Using Novel, Capsid-Mutated AAV Vectors, PLoS One. 2013; 8(4): e62097, который включен в настоящий документ посредством ссылки.

Как используется в настоящем документе по отношению к AAV, термин «вариант» означает любую последовательность AAV, полученную из известной последовательности AAV, включая те последовательности, которые имеют по меньшей мере 70%, по меньшей 35 мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 99% или выше идентичности последовательности по аминокислотной или нуклеотидной последовательности. В другом варианте осуществления капсид AAV включает в себя варианты, которые могут включать в себя до около 10% отличия от любой описанной или известной капсидной 40 последовательности AAV. То есть капсид AAV имеет от около 90% идентичности до около 99,9% идентичности, от около 95% до около 99% идентичности или от около 97% до около 98% идентичности с капсидом AAV, предложенным в настоящем документе и/или известным в данной области техники. В одном варианте осуществления капсид AAV имеет по меньшей мере 95% идентичности с капсидом AAV. При 45 определении процента идентичности капсида AAV сравнение может проводиться по любому из вариабельных белков (например, vp1, vp2 или vp3). В одном варианте осуществления капсид AAV имеет по меньшей мере 95% идентичности с vp3 AAV8. В другом варианте осуществления используется самокомплémentарный AAV.

ITR или другие компоненты AAV могут быть легко выделены или искусственно созданы из AAV с помощью методик, доступных специалистам в данной области техники. Такие AAV могут быть выделены, искусственно созданы или получены из академических, коммерческих или общедоступных источников (например, Американская коллекция типовых культур, г. Манассас, штат Вирджиния, США). Альтернативно, последовательности AAV могут быть искусственно созданы с помощью синтетических или других подходящих средств со ссылкой на опубликованные последовательности, такие как доступные в литературе или в базах данных, таких как, например, GenBank, PubMed и т.п. Вирусы AAV могут быть искусственно созданы с помощью традиционных методик молекулярной биологии, делая возможным оптимизацию этих частиц для специфической клеточной доставки нуклеотидных последовательностей, для минимизации иммуногенности, для регулирования стабильности и периода существования частиц, для эффективной деградации, для точной доставки в ядро и т.д.

Как используется в настоящем документе, термин «искусственный AAV» означает,

помимо прочего, AAV с капсидным белком, не встречающимся в природе. Подобный искусственный капсид может быть получен с помощью любой подходящей методики, используя выбранную последовательность AAV (например, фрагмент капсидного белка vp1) в комбинации с гетерологичными последовательностями, которые могут быть получены из разных выбранных AAV, непоследовательных частей одного и того же AAV, из вирусного источника, отличного от AAV, или из невирусного источника. Искусственный AAV может представлять собой, помимо прочего, псевдотипированный AAV, капсид химерного AAV, капсид рекомбинантного AAV или капсид «гуманизированного» AAV. Псевдотипированные векторы, в которых капсид одного AAV замещен гетерологичным капсидным белком, могут использоваться в настоящем изобретении. В одном варианте осуществления AAV2/5 и AAV2/8 являются примерами псевдотипированных векторов.

Для упаковки экспрессионной кассеты, или генома гAAV, или плазмида для продуцирования, или провирусной плазмида в вирионы ITR являются единственными компонентами AAV, необходимыми в цис-регуляции в одной и той же конструкции, что и трансген. В одном варианте осуществления кодирующие последовательности для репликации (rep) и/или капсид (cap) были удалены из генома AAV и поставлены в виде транс-факторов (in trans) или с помощью линии упаковывающих клеток, чтобы получить вектор AAV. Например, как было описано выше, псевдотипированный AAV может содержать ITR из источника, который отличается от источника капсида AAV. В одном варианте осуществления AAV2/5 и AAV2/8 являются примерами псевдотипированных векторов. Дополнительно или альтернативно, может использоваться капсид химерного AAV. Могут быть выбраны и другие компоненты AAV. В настоящем документе описаны источники таких последовательностей AAV, которые также могут быть выделены, искусственно созданы или получены из академических, коммерческих или общедоступных источников (например, Американская коллекция типовых культур, г. Манассас, штат Вирджиния, США). Альтернативно, последовательности AAV могут быть получены с помощью синтетических или других подходящих средств на основе опубликованных последовательностей, таких как доступные в литературе или в базах данных, таких как, например, GenBank®, PubMed® и т.п.

«Самокомплементарный AAV» относится к плазмиде или вектору, имеющим экспрессионную кассету, в которой кодирующий участок, переносимый нуклеотидной последовательностью рекомбинантного AAV, был разработан для образования внутримолекулярной матрицы двухцепочечных ДНК. При инфицировании вместо того,

чтобы ожидать клеточноопосредованного синтеза второй цепи, две комплементарные половины одноцепочечной AAV (оцAAV) (scAAV) будут связываться с образованием одной единицы двухцепочечной ДНК (дцДНК), которая готова к немедленной

репликации и транскрипции. См., например, D M McCarty et al, "Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis", Gene Therapy, (August 2001), Vol 8, Number 16, Pages 1248-1254.

Самокомплементарные AAV описаны, например, в патентах США №№6596535; 7125717 и 7456683, полное описание которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

В одном варианте осуществления AAV представляет собой самокомплементарный AAV2/8. См., например, Buie et al, Jan. 2010, Self-complementary AAV Virus (scAAV) Safe and Long-term Gene Transfer in the Trabecular Meshwork of Living Rats and Monkeys, Invest Ophthalmol Vis Sci., 51(1): 236-248, а также Ryals et al, Apr. 2011, Quantifying transduction efficiencies of unmodified and tyrosine capsid mutant AAV vectors in vitro using two ocular cell

lines, Mol Vis.; 17:1090-102, которые включены в настоящий документ посредством ссылки. В одном варианте осуществления AAV представляет собой

самокомплементарный AAV2/8, содержащий по меньшей мере мутацию Y733F. См. Ku et al, Dec. 2011, Gene therapy using self-complementary Y733F capsid mutant AAV2/8 restores vision in a model of early onset Leber congenital amaurosis, Hum Mol Genet., 20(23): 4569-4581,

который включен в настоящий документ посредством ссылки. В другом варианте осуществления AAV представляет собой самокомплементарный AAV2/8, содержащий по меньшей мере мутации Y447F+T733F+T494V. См. Kay et al, 2013, цитируемые в настоящем документе.

В одном варианте осуществления векторы, используемые в композициях и способах, описанных в настоящем документе, содержат как минимум последовательности, кодирующие выбранный капсид AAV, например капсид AAV8 или его фрагмент. В

другом варианте осуществления используемые векторы содержат как минимум последовательности, кодирующие выбранный гер-белок AAV, например гер-белок AAV5 или его фрагмент. Необязательно, такие векторы могут содержать сар- и гер-

белки AAV. В векторах, в которых обеспечиваются оба гер и сар AAV, обе последовательности гер AAV и сар AAV могут иметь одинаковое происхождение, например все они могут происходить от AAV5 или от AAV7 и т.д.

Альтернативно, могут использоваться векторы, в которых гер-последовательности были получены из AAV, который отличается от вируса, из которого были получены

сар-последовательности. В одном варианте осуществления гер- и сар-последовательности экспрессируются из разных источников (например, отдельные векторы или клетка-хозяин и вектор). В другом варианте осуществления гер-последовательности сливают в рамке с сар-последовательностями другого AAV для образования вектора химерного AAV, такого как AAV2/8, описанного в патенте США №7282199, который включен в

настоящий документ посредством ссылки.

Некоторые композиции, описанные в настоящем документе, представляют собой выделенные либо синтетически или рекомбинантно созданные нуклеотидные последовательности, которые обеспечивают новые кодон-оптимизированные последовательности, кодирующие функциональный RDH12. В одном варианте

осуществления оптимизированные нуклеотидные последовательности, кодирующие конструкции hRDH12, описанные в настоящем документе, искусственно создаются и помещаются в любой подходящий генетический элемент, например «голую ДНК», фаг, транспозон, космиду, молекулу РНК (например, мРНК), эписому и т.д., который

переносит размещенные на нем последовательности RDH12 в клетку-хозяина, например, для получения наночастиц, несущих ДНК или РНК, вирусных векторов в упаковывающей клетке-хозяине и/или для доставки в клетку-хозяина субъекта. В одном варианте осуществления генетический элемент представляет собой плазмиду.

- 5 Выбранный генетический элемент может быть доставлен любым подходящим способом, включая трансфекцию, электропорацию, липосомную доставку, с помощью методик слияния мембраны, с помощью введения с высокой скоростью покрытых ДНК гранул, вирусную инфекцию и слияние протопластов. Способы, которые используются для создания таких конструкций, известны специалистам в области манипуляций с 10 нуклеиновыми кислотами и включают в себя генную инженерию, рекомбинантную инженерию и синтетические методики. См., например, Green and Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (2012).

Предлагаются различные экспрессионные кассеты, которые используют SEQ ID NO. 3 для экспрессии множества или различных версий белка hRDH12. Как используется в 15 настоящем документе, «экспрессионная кассета» относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая содержит кодирующие последовательности для оптимизированных белков RDH12, промотор и может включать в себя другие регуляторные последовательности для этого, причем кассета может быть искусственно создана и 20 помещена в генетический элемент или плазмиду и/или упакована в капсид вирусного вектора (например, вирусную частицу). В одном варианте осуществления экспрессионная кассета включает в себя кодон-оптимизированную нуклеотидную последовательность, которая кодирует RDH12. В одном варианте осуществления кассета обеспечивает кодон-оптимизированный RDH12, функционально связанный с регулирующими экспрессию 25 последовательностями, которые направляют в клетке-хозяине экспрессию кодон-оптимизированной нуклеотидной последовательности, кодирующую RDH12.

В другом варианте осуществления экспрессионная кассета включает в себя кодон-оптимизированную нуклеотидную последовательность, которая кодирует RDH12. В одном варианте осуществления кассета обеспечивает кодон-оптимизированный RDH12, функционально связанный с регулирующими экспрессию последовательностями, 30 которые направляют в клетке-хозяине экспрессию кодон-оптимизированной нуклеотидной последовательности, кодирующую RDH12.

В еще одном варианте осуществления экспрессионная кассета включает в себя кодон-оптимизированную нуклеотидную последовательность, которая кодирует функциональный оптимизированный RDH12. В одном варианте осуществления подобной 35 экспрессионной кассеты последовательность, кодирующая RDH12, функционально связана с первой (-ыми) регулирующей (-ими) экспрессию последовательностью (-ями), которые направляют экспрессию встречающейся в природе нуклеотидной последовательности, кодирующей RDH12 в клетке-хозяине. Как было описано выше для экспрессионных кассет, содержащих RDH12, в вариантах осуществления, которые 40 экспрессируют множество копий или множество различных версий функционального RDH12, кодон-оптимизированная последовательность может быть размещена в 5' или 3' направлении относительно другой версии последовательностей. Специалист в данной области техники сможет легко разработать конструкции для экспрессии множества копий RDH12 с учетом идей настоящего описания и предшествующего уровня техники.

45 Как описано в настоящем документе, экспрессионная кассета может быть фланкирована на своем 5' конце последовательностью инвертированного концевого повтора (ITR) 5'AAV или на своем 3' конце ITR 3' AAV. Таким образом, эта экспрессионная кассета, фланкированная ITR rAAV, содержит минимальные

последовательности, необходимые для упаковки экспрессионной кассеты в вирусной частице AAV, т.е. ITR AAV 5' и 3'. ITR AAV могут быть получены из последовательностей ITR любого AAV, такого как описанный в настоящем документе. Эти ITR могут иметь одинаковое происхождение AAV, что и капсид, используемый в полученном в результате

5 рекомбинантном AAV, или различное происхождение AAV (для получения псевдотипа AAV). В одном варианте осуществления последовательности ITR из AAV2 или их версия с делецией (ΔITR) используются для удобства и ускорения регуляторного подтверждения. Однако могут быть выбраны ITR из других источников AAV. Каждый геном гAAV может затем быть введен в провирусную плазмиду в соответствии с идеями WO 2012/

10 158757. Провирусные плазмиды культивируются в клетках-хозяевах, которые экспрессируют сар- и/или гер-белки AAV. В клетках-хозяевах каждый геном гAAV сохраняют и упаковывают в капсидном белке или оболочечном белке для образования инфекционной вирусной частицы.

В еще одном варианте осуществления предлагается вектор, содержащий любую из 15 экспрессионных кассет, описанных в настоящем документе. Как было описано выше, такие векторы могут представлять собой плазмиды различного происхождения и используются в некоторых вариантах осуществления для получения рекомбинантных дефектных по репликации вирусов, как описано далее в настоящем документе.

В другом варианте осуществления вектор представляет собой провирусную плазмиду, 20 которая содержит капсид AAV и экспрессионную кассету,flenкированную ITR рекомбинантного AAV, причем указанная кассета содержит кодон-оптимизированную нуклеотидную последовательность, кодирующую RDH12 или множество (т.е. по меньшей мере две) копий RDH12, а также регулирующие экспрессию последовательности, которые направляют экспрессию кодируемого белка в клетке-хозяине.

25 Один тип провирусной плазмиды содержит модульную рекомбинантную экспрессионную кассету, которая позволяет удалять части компонентов кассеты и многократно замещать их другими компонентами, не уничтожая сайты рестрикции в плазмиде. Подобная провирусная плазмida является такой, которая содержит 5' последовательность ITR AAV, причем ITR фланкируется выше сайтом 1 рестрикции и 30 ниже сайтом 2 рестрикции; выбранный промотор фланкируется выше сайтом 2 рестрикции и ниже сайтом 3 рестрикции. Другим компонентом модульного гAAV является полилинкерная последовательность, содержащая по меньшей мере сайт 3 рестрикции, сайт 4 рестрикции и сайт 5 рестрикции, который содержит кодон-оптимизированную нуклеотидную последовательность, кодирующую RDH12, или две 35 или более копий последовательности, кодирующей RDH12, причем по меньшей мере одна такая последовательность является кодон-оптимизированной нуклеотидной последовательностью, кодирующей RDH12. Последовательности, кодирующие RDH12, расположены между любыми двумя сайтами рестрикции 3, 4 и 5, функционально соединены с промотором и находятся под его регулирующим контролем. Альтернативно, 40 вторую кодирующую последовательность вставляют в полилинкерную последовательность вместе со второй регулирующей экспрессию последовательностью экспрессионной кассеты, как было описано выше.

Дополнительные компоненты модульной кассеты гAAV включают в себя 45 последовательность полиаденилирования, фланкированную выше сайтом 4 или 5 рестрикции и ниже сайтом 6 рестрикции; а также 3' последовательность ITR AAV, фланкированную выше сайтом 6 рестрикции и ниже сайтом 7 рестрикции. Провирусная плазмida также содержит элементы, необходимые для репликации в бактериальных клетках, и ген устойчивости. Каждый из упомянутых выше сайтов 1-7 рестрикции

присутствует только один раз в провирусной плазмиде и расщепляется отдельным ферментом, который не способен расщеплять другой сайт рестрикции в плазмиде и, таким образом, обеспечивает независимое и многократное удаление, замещение или замену всей модульной кассеты rAAV или только тех элементов, которые flankированы этими сайтами рестрикции, из плазмиды. Такие плазмиды подробно описаны в публикации международной заявки на патент № WO 2012/158757, включенной в настоящий документ посредством ссылки.

Подходящий рекомбинантный адено-ассоциированный вирус (AAV) получают путем культивирования клетки-хозяина, которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую капсидный белок серотипа адено-ассоциированного вируса (AAV) или его фрагмент, как определено в настоящем документе; функциональный гер-ген; миниген, состоящий из как минимум инвертированных концевых повторов (ITR) AAV и нуклеотидной последовательности NPHP5; а также достаточные хелперные функциональные элементы, чтобы обеспечить упаковку минигена в капсидном белке AAV. Компоненты, необходимые для культивирования в клетке-хозяине для упаковки минигена AAV в капside AAV, могут быть доставлены в клетку-хозяина в виде транс-факторов (trans). Альтернативно, один или более требуемых компонентов (например, миниген, гер-последовательности, сар-последовательности и/или хелперные функциональные элементы) могут обеспечиваться стабильной клеткой-хозяином, которая была искусственно создана таким образом, чтобы содержать один или более требуемых компонентов, с помощью методов, известных специалистам в данной области техники.

Наиболее соответствующим образом, такая стабильная клетка-хозяин будет содержать требуемый(-е) компонент(-ы) под контролем индуцибельного промотора. Однако требуемый(-е) компонент(-ы) могут находиться под контролем конститутивного промотора. Примеры подходящих индуцибельных и конститутивных промоторов предлагаются в настоящем документе ниже в обсуждении регуляторных элементов, подходящих для использования с трансгеном, т.е. RDH12. В еще одном альтернативном варианте выбранная стабильная клетка-хозяин может содержать выбранный(-е) компонент(-ы) под контролем конститутивного промотора и другие выбранные компоненты под контролем одного или более индуцибельных промоторов. Например, может быть создана стабильная клетка-хозяин, которая была получена из клеток 293 (которые содержат хелперные функциональные элементы E1 под контролем конститутивного промотора), но которая содержит гер- и/или сар-белки под контролем индуцибельных промоторов. Другие стабильные клетки-хозяева также могут быть получены специалистом в данной области техники.

Миниген, гер-последовательности, сар-последовательности и хелперные функциональные элементы, необходимые для получения rAAV настоящего изобретения, могут быть доставлены в упаковывающую клетку-хозяина в форме любого генетического элемента, который переносит размещенные на нем последовательности. Выбранный генетический элемент может быть доставлен любым подходящим способом, включая способы, описанные в настоящем документе. Способы, которые используются для конструирования любого варианта осуществления настоящего изобретения, известны специалистам в области манипуляций с нукleinовыми кислотами и включают в себя генную инженерию, рекомбинантную инженерию и синтетические методики. См., например, Sambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY. Аналогичным образом, способы получения вирионов rAAV хорошо известны, и выбор подходящего способа не ограничивает настоящее

изобретение. См., например, K. Fisher et al, 1993 J. Virol., 70:520-532 и патент США 5478745, среди прочих. Эти публикации включены в настоящий документ посредством ссылки.

Миниген состоит, как минимум, из нуклеотидной последовательности RDH12

5 (трансген), как было описано выше, ее регуляторных последовательностей, а также 5' и 3' инвертированных концевых повторов (ITR) AAV. В одном предпочтительном варианте осуществления используются ITR AAV серотипа 2. Однако могут быть выбраны ITR других подходящих серотипов. Но именно этот миниген упаковывают в капсидный белок и доставляют в выбранную клетку-хозяина.

10 Регуляторные последовательности включают в себя традиционные контрольные элементы, которые функционально соединены с геном RDH12 таким образом, который обеспечивает его транскрипцию, трансляцию и/или экспрессию в клетке, трансфицированной вектором или инфицированной вирусом, полученными в настоящем изобретении. Как используется в настоящем документе, «функционально соединенные»  
15 последовательности включают в себя как регулирующие экспрессию последовательности, которые являются смежными с представляющим интерес геном, так и регулирующими экспрессию последовательностями, которые действуют в виде транс-факторов (trans) или дистанционно для контроля представляющего интерес гена.

Регулирующие экспрессию последовательности включают в себя соответствующие 20 последовательности инициации транскрипции, последовательности терминации транскрипции, промоторные и энхансерные последовательности; эффективные сигналы процессинга РНК, такие как сигналы сплайсинга и полиаденилирования (polyA); последовательности, которые стабилизируют цитоплазматическую мРНК;  
25 последовательности, которые повышают эффективность трансляции (т.е. консенсусная последовательность Козак); последовательности, которые повышают стабильность белка; а также при желании последовательности, которые повышают секрецию кодируемого продукта. В данной области техники хорошо известно и может использоваться большое количество регулирующих экспрессию последовательностей, включая промоторы.

30 Регуляторные последовательности, используемые в конструкциях настоящего изобретения, могут также содержать инtron, предпочтительно расположенный между промоторной/энхансерной последовательностью и геном. Одну предпочтительную интронную последовательность получают из SV-40, и она является мини-интронным донором/акцептором сплайсинга длиной 100 п. о., называемым SD-SA. Другая  
35 подходящая последовательность включает в себя посттранскрипционный элемент вируса гепатита сурков. (См., например, L. Wang and I. Verma, 1999 Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 96:3906-3910). Сигналы polyA могут быть получены от многих подходящих видов, включая, помимо прочего, человеческий или бычий SV-40.

Другим регуляторным компонентом rAAV, используемым в способе настоящего 40 изобретения, является участок внутренней посадки рибосомы (IRES). IRES-последовательность или другая подходящая система могут использоваться для получения более одного полипептида из одного транскрипта гена. IRES (или другая подходящая последовательность) используется для получения белка, который содержит более одной полипептидной цепи, или для экспрессии двух различных белков из или 45 внутри одной и той же клетки. Примером IRES является последовательность участка внутренней посадки рибосомы полиовируса, которая поддерживает экспрессию трансгена в фоторецепторах, ПЭС и ганглиозных клетках. Предпочтительно IRES расположен в 3' направлении относительно трансгена в векторе rAAV.

Выбор промотора, который будет использоваться в гAAV, может осуществляться из большого количества конститутивных или индуцибельных промоторов, которые могут экспрессировать выбранный трансген в желаемой глазной клетке. В другом варианте осуществления промотор является клеточно-специфическим. Термин

5 «клеточно-специфический» означает, что конкретный промотор, выбранный для рекомбинантного вектора, может направлять экспрессию выбранного трансгена в конкретном типе глазной клетки. В одном варианте осуществления промотор является специфическим для экспрессии трансгена в фоторецепторных клетках. В другом варианте осуществления промотор является специфическим для экспрессии в палочках и

10 колбочках. В другом варианте осуществления промотор является специфическим для экспрессии в палочках. В другом варианте осуществления промотор является специфическим для экспрессии в колбочках. В другом варианте осуществления промотор является специфическим для экспрессии трансгена в клетках ПЭС. В другом варианте осуществления трансген экспрессируется в любой из указанных выше глазных клеток.

15 Промотор может быть получен от любого вида. Примером промоторов может быть промотор протеинкиназы 1 сопряженного с G-белком рецептора (GRK1) человека (учетный номер Genbank AY 327580). В другом варианте осуществления промотор представляет собой фрагмент из 292 нт (положения 1793-2087) промотора GRK1 (см. Beltran et al, Gene Therapy 2010 17:1162-74, который включен в настоящий документ 20 посредством ссылки). В другом предпочтительном варианте осуществления промотор представляет собой проксимальный промотор межфоторецепторного ретинолсвязывающего белка (IRBP) человека. В одном варианте осуществления промотор представляет собой фрагмент из 235 нт промотора hIRBP.

В другом варианте осуществления промотор представляет собой нативный промотор 25 для гена, который подлежит экспрессии. В одном варианте осуществления промотор представляет собой проксимальный промотор RDH12. К другим промоторам, пригодным для использования в настоящем изобретении, относится, помимо прочего, проксимальный промотор RPGR (Shu et al, IOVS, May 2102), промотор палочкового опсина, промотор красно-зеленого опсина, промотор синего опсина, промотор cGMP-30 Р-fosфодиэстеразы, опсиновый промотор мыши (Beltran et al 2010, процитированный выше), родопсиновый промотор (Mussolini et al, Gene Ther, July 2011, 18(7):637-45); альфа-субъединица колбочкового трансдуцина (Morrissey et al, BMC Dev Biol, Jan 2011, 11:3); промотор бета-фосфодиэстеразы (ФДЭ); промотор пигментной дегенерации сетчатки (ПДС-1) (Nicord et al, J. Gene Med, Dec 2007, 9(12): 1015-23); промотор NXNL2/35 NXNL1 (Lambard et al, PLoS One, Oct. 2010, 5(10):e13025), промотор RPE65; промотор медленной дегенерации сетчатки/периферина 2 (Rds/perph2) (Cai et al, Exp Eye Res. 2010 Aug;91(2): 186-94); а также промотор VMD2 (Kachi et al, Human Gene Therapy, 2009 (20: 31-9)). Каждый из этих документов включен в настоящий документ посредством ссылки. В другом варианте осуществления промотор выбирают из промотора EF1 $\alpha$  человека, 40 родопсинового промотора, промоторов родопсинкиназы, межфоторецепторного ретинолсвязывающего белка (IRBP), колбочкового опсины (красно-зеленого, синего), восходящих последовательностей колбочкового опсины, содержащих регулятор локуса красно-зеленых колбочек, промоторов трансдукции колбочек и фактора транскрипции (нейронная ретинальная лейциновая застежка (Nrl) и фоторецептор-специфический 45 ядерный рецептор Nr2e3, bZIP).

В одном варианте осуществления промотор имеет малый размер, менее 1000 п. о., вследствие ограничений по размеру вектора AAV. В другом варианте осуществления размер промотора составляет менее 400 п. о. Другие промоторы могут быть выбраны

специалистом в данной области техники.

В другом варианте осуществления промотор представляет собой универсальный или конститутивный промотор. Примером подходящего промотора является гибридный промотор  $\beta$ -актина курицы (CBA) с энхансерными элементами цитомегаловируса

<sup>5</sup> (CMV). В другом варианте осуществления промотор представляет собой промотор CB7. К другим подходящим промоторам относится промотор  $\beta$ -актина человека, промотор фактора-1 $\alpha$  элонгации человека, промотор цитомегаловируса (CMV), промотор обезьяньего вируса 40 и промотор тимидинкиназы вируса простого герпеса.

См., например, Damdindorj et al, (August 2014) A Comparative Analysis of Constitutive

<sup>10</sup> Promoters Located in Adeno-Associated Viral Vectors. PLoS ONE 9(8): e106472. К другим подходящим промоторам относятся вирусные промоторы, конститутивные промоторы, регулируемые промоторы [см., например, WO 2011/126808 и WO 2013/04943].

Альтернативно, промотор, чувствительный к физиологическим условиям, может использоваться в экспрессионной кассете, геномах rAAV, векторах, плазмидах и вирусах,

<sup>15</sup> описанных в настоящем документе. В одном варианте осуществления промотор имеет малый размер, менее 1000 п. о., вследствие ограничений по размеру вектора AAV. В другом варианте осуществления размер промотора составляет менее 400 п. о. Другие промоторы могут быть выбраны специалистом в данной области техники.

К примерам конститутивных промоторов, пригодных для использования в настоящем изобретении, относятся, помимо прочего, ретровирусный промотор ДКП вируса саркомы Раяса (BCP) (необязательно с энхансером BCP), промотор цитомегаловируса (CMV) (необязательно с энхансером CMV), промотор SV40, промотор дигидрофолатредуктазы, промотор  $\beta$ -актина курицы (CBA), промотор фосфоглицеринкиназы (ФГК), промотор EF1 (Invitrogen) и немедленно ранний энхансер CMV, связанный с промотором CBA (Beltran et al, Gene Therapy 2010 процитированный выше).

Индуцильные промоторы позволяют осуществлять регуляцию экспрессии генов, и их можно регулировать с помощью экзогенно поставляемых соединений, факторов окружающей среды, таких как температура, или наличия специфического

<sup>30</sup> физиологического состояния, например, острой фазы, конкретного состояния дифференцировки клетки или только в реплицирующихся клетках. Индуцильные промоторы и индуцильные системы доступны из множества коммерческих источников, включая, помимо прочего, компании Invitrogen, Clontech и Ariad. Были описаны многие другие системы, и их легко может выбрать специалист в данной области техники. К

<sup>35</sup> примерам индуцильных промоторов, регулируемых с помощью экзогенно поставляемых соединений, относится цинк-индуцируемый промотор металлотионина (MT) овцы, индуцируемый дексаметазоном (Dex) промотор вируса опухоли молочной железы мышей (MMTV), промоторная система полимеразы T7; промотор эндизона насекомых, тетрациклин-репрессируемая система, тетрациклин-индуцируемая система,

<sup>40</sup> RU486-индуцируемая система и рапамицин-индуцируемая система. Другими типами индуцильных промоторов, которые могут использоваться в настоящем контексте, являются те, которые регулируются с помощью специфического физиологического состояния, например температуры, острой фазы, конкретного состояния дифференцировки клетки или только в реплицирующихся клетках. Может использоваться

<sup>45</sup> любой тип индуцильного промотора, который жестко регулируется и является специфическим для конкретного типа глазной клетки-мишени.

В других вариантах осуществления кассета, вектор, плазмида и вирусные конструкции, описанные в настоящем документе, содержат другие соответствующие

последовательности инициации транскрипции, последовательности терминации транскрипции, энхансерные последовательности; эффективные сигналы процессинга РНК, такие как сигналы сплайсинга и полиаденилирования (polyA); последовательности ТАТА; последовательности, которые стабилизируют цитоплазматическую мРНК;

5 последовательности, которые повышают эффективность трансляции (т.е. консенсусная последовательность Козак); интроны; последовательности, которые повышают стабильность белка; а также при желании последовательности, которые повышают секрецию кодируемого продукта. Экспрессионная кассета или вектор могут не содержать, содержать один или более из любых элементов, описанных в настоящем

10 документе. К примерам подходящих последовательностей polyA относится, например, polyA SV40, бычьего гормона роста (bGH) и ТК. К примерам подходящих энхансеров относится, среди прочих, например, энхансер CMV, энхансер ВСР, энхансер альфа-фетопротеина, минимальный энхансер/промотор TTR, LSP (промотор TH-связывающего глобулина/энхансер альфа1 -микроглобулина/бикунина).

15 К другим энхансерным последовательностям, пригодным для использования в настоящем изобретении, относится энхансер IRBP (Nicord 2007, процитированный выше), немедленно ранний энхансер цитомегаловируса, полученный из гена иммуноглобулина энхансер или энхансер SV40, цис-действующий элемент, идентифицированный в проксимальном промоторе мыши, и т.д.

20 Выбор этих и других распространенных векторных и регуляторных элементов является традиционным, и доступны многие подобные последовательности. См., например, Sambrook et al, а также ссылки, цитируемые в нем, например, на страницах 3.18-3.26 и 16.17-16.27, и Ausubel et al, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, 1989). Конечно, не все векторы и регулирующие экспрессию

25 последовательности будут одинаково хорошо функционировать для экспрессии всех трансгенов настоящего изобретения. Однако специалист в данной области техники может выбирать из этих и других регулирующих экспрессию последовательностей без отхода от объема и сущности настоящего изобретения.

Способы получения и выделения вирусных векторов AAV, подходящих для доставки 30 субъекту, известны в данной области техники. См., например, патент США 7790449; патент США 7282199; WO 2003/042397; WO 2005/033321, WO 2006/110689 и патент США 7588772 B2. В одной системе клеточную линию-продуцент временно трансфицируют конструкцией, которая кодирует трансген, фланкированный ITR, и конструкцией(-ями), которая(-ые) кодирует(-ют) гер и сар. Во второй системе линию упаковывающих клеток,

35 которая стабильно поставляет гер и сар, временно трансфицируют конструкцией, которая кодирует трансген, фланкированный ITR. В каждой из этих систем вирионы AAV вырабатываются в ответ на инфекцию хелперным аденоизвестом или вирусом герпеса, что требует отделения гAAV от контаминирующего вируса. Совсем недавно были разработаны системы, которые не требуют инфицирования хелперным вирусом для

40 восстановления AAV - необходимые хелперные функциональные элементы (т.е. аденоизвест E1, E2a, VA и E4 или вирус герпеса UL5, UL8, UL52 и UL29, а также полимераза вируса герпеса) также поставляются системой в виде транс-факторов. В этих более новых системах хелперные функциональные элементы могут поставляться путем временной трансфекции клеток конструкциями, которые кодируют требуемые 45 хелперные функции, или клетки могут быть искусственно созданы с возможностью стабильно содержать гены, кодирующие хелперные функции, экспрессию которых можно контролировать на транскрипционном или посттранскрипционном уровне.

В еще одной системе трансген, фланкированный ITR, и гер/сар-гены вводятся в клетки

насекомых путем инфицирования векторами на основе бакуловируса. Обзоры этих систем продуцирования см., в целом, например, у Zhang et al, 2009, "Adenovirus-adeno-associated virus hybrid for large-scale recombinant adeno-associated virus production," Human Gene Therapy 20:922-929, полное содержание которого включено в настоящий документ

5 посредством ссылки. Способы создания и использования этих и других систем продуцирования AAV также описаны в следующих патентах США, полное содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки: 5139941; 5741683; 6057152; 6204059; 6268213; 6491907; 6660514; 6951753; 7094604; 7172893; 7201898; 7229823 и 7439065. См., в целом, например, Grieger & Samulski, 2005, "Adeno-associated 10 virus as a gene therapy vector: Vector development, production and clinical applications," Adv. Biochem. Engin/Biotechnol. 99: 119-145; Buning et al, 2008, "Recent developments in adeno-associated virus vector technology," J. Gene Med. 10:717-733; и ссылки, цитируемые ниже, полное содержание каждой из которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

15 Способы, которые используются для конструирования любого варианта осуществления настоящего изобретения, известны специалистам в области манипуляций с нуклеиновыми кислотами и включают в себя генную инженерию, рекомбинантную инженерию и синтетические методики. См., например, Green and Sambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (2012).  
20 Аналогичным образом, способы получения вирионов rAAV хорошо известны, и выбор подходящего способа не ограничивает настоящее изобретение. См., например, K. Fisher et al, (1993) J. Virol., 70:520-532 и патент США 5478745.

В других вариантах осуществления кассета, вектор, плазмида и вирусные конструкции, описанные в настоящем документе, содержат другие соответствующие 25 последовательности инициации транскрипции, последовательности терминации транскрипции, энхансерные последовательности; эффективные сигналы процессинга РНК, такие как сигналы сплайсинга и полиденилирования (polyA); последовательности ТАТА; последовательности, которые стабилизируют цитоплазматическую мРНК; последовательности, которые повышают эффективность трансляции (т.е. консенсусная 30 последовательность Козак); интроны; последовательности, которые повышают стабильность белка; а также при желании последовательности, которые повышают секрецию кодируемого продукта. Экспрессионная кассета или вектор могут не содержать, содержать один или более из любых элементов, описанных в настоящем документе. К примерам подходящих последовательностей polyA относится, например, 35 polyA SV40, бычьего гормона роста (bGH) и ТК. К примерам подходящих энхансеров относится, среди прочих, например, энхансер CMV, энхансер ВСР, энхансер альфа-фетопротеина, минимальный энхансер/промотор TTR, LSP (промотор TH-связывающего глобулина/энхансер альфа1 -микроглобулина/бикунина).

Таким образом, в одном варианте осуществления новые провирусные плазмиды 40 AAV несут нативные или оптимизированные кДНК ретинол-дегидрогеназы 12 (RDH12), которые кодируют нормальный или функциональный белок RDH12, причем такие плазмиды можно упаковать в векторах AAV. Эти векторы продемонстрировали биологическую активность как *in vitro*, так и *in vivo*.

В одном варианте осуществления способ получения рекомбинантного rAAV включает 45 в себя получения плазмиды, содержащей геном rAAV, как описано выше, и культивирование упаковывающей клетки, несущей плазмиду, в присутствии достаточного количества вирусных последовательностей для обеспечения упаковки вирусного генома AAV в инфекционной оболочке или капсиде AAV. Специфические

методы получения векторов гAAV описаны выше и могут применяться для получения вектора гAAV, который может доставлять один или более кодон-оптимизированных RDH12 или RDH12 в экспрессионные кассеты и геномы, описанные выше и в примерах ниже.

- 5 В еще одном аспекте используется способ редактирования генов для коррекции мутации или нежелательной последовательности гена RDH12 в глазе. В одном предпочтительном способе редактирования генов используется система CRISPR/Cas9. CRISPR/Cas - это методика, которая была описана как имеющая потенциал для коррекции заболеваний, связанных с генетической мутацией или специфическим 10 фенотипом. Система коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами (CRISPR), и CRISPR-связанного белка (Cas9) имеет два отдельных компонента: (1) направляющую РНК и (2) эндонуклеазу, в данном случае CRISPR-связанную (Cas) нуклеазу, Cas9.

Направляющая РНК представляет собой комбинацию эндогенной бактериальной 15 crРНК (CRISPR РНК) и tracrРНК (трансактивирующей crРНК) в одном химерном транскрипте направляющей РНК (нРНК). нРНК объединяет направленную специфичность crРНК с поддерживающими свойствами tracrРНК в одном транскрипте. Когда нРНК и Cas9 экспрессируются в клетке, геномную последовательность-мишень 20 можно модифицировать или необратимо разрушить. Эта система применялась в геномной инженерии для систем млекопитающих, см., например, Cong, L. et al 2013. Science 339: 819-823; Mali, P., et al 2013 Science 339: 823-826; Ran, F.A., et al 2013. Nat. Protoc. 8: 2281-2308; and Shalem, O., et al 2014 Science 343: 84-87. Система CRISPR типа II 25 является в настоящее время наиболее широко используемой технологией РНК-направляемой эндонуклеазы в геномной инженерии. Адено-ассоциированные вирусы были описаны как пригодные для использования векторы в генной терапии, включающей систему CRISPR-Cas. См., например, Yin et al, 2014 Biotechnology, 32: 551-3 и 2015 Nature Biotechnology, 33: 102-6.

В еще одном варианте осуществления эти методики редактирования генов могут применяться к выбранным клеткам для вставки последовательности, кодирующей 30 RDH12 (нативной или кодон-оптимизированной). Такие клетки могут включать в себя клетки НЕРГ2 или индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (иПСК), которые могут затем использоваться как модели для исследования функций векторов, рекомбинантных вирусов и других композиций и реагентов из настоящего документа.

В других аспектах эти нуклеотидные последовательности, векторы, провирусные 35 плазмиды, экспрессионные кассеты, фланкованные гAAV-ITR экспрессионные кассеты, вирусные векторы, включая вирусные векторы гAAV, пригодны для использования в фармацевтических композициях, которые также содержат фармацевтически приемлемый носитель. Такие фармацевтические композиции используются для экспрессии оптимизированного RDH12 или множества копий RDH12 в глазных клетках путем 40 доставки таких рекомбинантно созданных AAV или искусственных AAV.

Для получения этих офтальмологических фармацевтических композиций, содержащих нуклеотидные последовательности, векторы, геномы гAAV и вирусные векторы гAAV, последовательности, или векторы, или вирусные векторы предпочтительно оценивают на предмет загрязнения традиционными способами, а затем составляют в 45 фармацевтическую композицию, подходящую для введения в глаз. В целом, офтальмологические фармацевтические препараты представляют собой стерильные составы, по существу не содержащие инородных частиц, подходящим образом составленные и упакованные для инсталляции в глаз. В одном варианте осуществления

состав подходит для субретинальной инъекции. Такой состав предполагает использование фармацевтически и/или физиологически приемлемых основы или носителя, в частности таких, которые являются пригодными для введения в глаз. К подходящим фармацевтическим носителям относятся фосфатно-солевые буферные растворы, вода, эмульсии, такие как эмульсии или микроэмulsionи масло/вода, суспензии, различные типы смачивающих агентов, стерильные растворы, в липосомах, в ниосомах, дисконах или даже в мазях или гелях, такие как забуференный физиологический раствор или другие буфера, например НЕРЕС, для поддержания рН на соответствующих физиологических уровнях.

Необязательно, включаются другие лекарственные средства, такие как фармацевтические агенты, стабилизирующие агенты, буфера, адьюванты, разбавители или поверхностно-активные вещества и т.д. Для инъекций носитель, как правило, будет представлять собой жидкость. К примерам физиологически приемлемых носителей относится стерильная апирогенная вода и стерильный апирогенный фосфатно-солевой буфер. Множество таких известных носителей предлагаются в публикации патента США №7629322, включенного в настоящий документ посредством ссылки. В одном варианте осуществления носитель представляет собой изотонический раствор хлорида натрия. В другом варианте осуществления носитель представляет собой сбалансированный солевой раствор. В одном варианте осуществления носитель включает в себя Твин. Если вирус должен храниться в течение длительного периода времени, его можно заморозить в присутствии глицерина или Твина-20.

В одном варианте осуществления содержимое состава разработано таким образом, чтобы поддерживать уровень рН в диапазоне от 4,75 до 7,40. Тоничность препаратов для местного применения также необходимо откорректировать до значения, близкого к значению в естественных слезах. Как правило, диапазон значений тоничности физиологического раствора от 0,5% до 2% хорошо переносится. К подходящим поверхностно-активным веществам также относятся, например, синтетические поверхностно-активные вещества, такие как колфосцерила пальмитат (Эксосурф), смесь ДПФХ с гексадеканолом и тилоксанолом, добавленными как усиливающие растекание агенты; Пумактант, смесь ДПФХ и ПГ; KL-4, который состоит из ДПФХ, пальмитоил-олеил-фосфатидилглицерина и пальмитиновой кислоты, объединенных с синтетическим пептидом, содержащим 21 аминокислоту, который имитирует структурные характеристики SP-B; Вентикут, комбинация ДПФХ, ПГ, пальмитиновой кислоты и рекомбинантного SP-C; или поверхностно-активные вещества животного происхождения, такие как Берактант (Альвеофакт или Сурванта), Кальфактант (Инфасурф) или Порактант альфа (Куркосурф). Другим пригодным для использования поверхностно-активным веществом является Сурфаксин (одобренный FDA синтетический пептид). Еще одним пригодным для использования поверхностно-активным веществом является Плюроник F68.

В одном примере специфического варианта осуществления подходящий состав содержит 180 mM NaCl, 10 mM натрий-фосфатного буфера (NaPi), рН 7,3 с 0,0001%-0,01% поверхностно-активного вещества Плюроник F68 (PF68). Точная композиция солевого компонента буфера находится в диапазоне от 160 mM до 180 mM NaCl. Необязательно, другой рН-буфер (потенциально НЕРЕС, бикарбонат натрия или TRIS) используется вместо конкретно описанного буфера. В еще одном альтернативном варианте используется буфер, содержащий 0,9% NaCl.

Необязательно, композиция настоящего изобретения может содержать, помимо гААВ и/или вариантов и носителя(-ей), другие традиционные фармацевтические

ингредиенты, такие как консерванты или химические стабилизаторы. К подходящим примерам консервантов относится хлорбутанол, сорбат калия, сорбиновая кислота, диоксид серы, пропилгаллат, парабены, этилованилин, глицерин, фенол и параклорфенол. К подходящим химическим стабилизаторам относится желатин и альбумин.

- 5 Фармацевтические композиции, содержащие дефектные по репликации вирусы гAAV, могут быть составлены с физиологически приемлемым носителем для применения при переносе генов и в применении генной терапии. В случае вирусных векторов AAV количественное определение геномных копий (ГК), векторных геномов или вирусных частиц может использоваться в качестве измерения дозы, которая содержится в составе
- 10 или суспензии. Может применяться любой известный в данной области техники способ для определения количества геномных копий (ГК) дефектных по репликации вирусов композиций настоящего изобретения. Один способ осуществления титрования количества ГК AAV заключается в следующем: Очищенные образцы вектора AAV сначала обрабатывают ДНКазой для устранения ДНК неинкапсидированного генома
- 15 AAV или контаминирующей плазмидной ДНК из процесса продуцирования. Устойчивые к ДНКазе частицы затем подвергают термообработке, чтобы высвободить геном из капсида. Высвобожденные геномы затем количественно оцениваются с помощью ПЦР в режиме реального времени, используя наборы праймеров/зондов, которые нацеливаются на специфический участок вирусного генома (как правило, сигнал poly
- 20 А). В другом способе эффективная доза рекомбинантного адено-ассоциированного вируса, несущего в себе нуклеотидную последовательность, кодирующую оптимизированный трансген RDH12, предпочтительно измеряется в соответствии с тем, как описано у S.K. McLaughlin et al, 1988 J. Virol., 62:1963. В другом способе титр определяют с помощью капельной цифровой ПЦР (кцПЦР). См. Lock как описано,
- 25 например, у M. Lock et al, Hu Gene Therapy Methods, 2014 Apr; 25(2): 115-25. doi: 10.1089/hgtb.2013.131. Epub 2014 Feb 14, который включен в настоящий документ посредством ссылки.

Термин «введение», как используется в способах, означает доставку композиции в выбранную клетку-мишень, которая характерна для болезни глаз. В одном варианте 30 осуществления способ включает в себя доставку композиции путем субретинальной инъекции в фоторецепторные клетки или другие глазные клетки. В другом варианте осуществления используется интравитреальная инъекция в глазные клетки. В еще одном варианте осуществления может использоваться инъекция через вену века для доставки в глазные клетки. Специалистом в данной области техники могут быть выбраны и 35 другие способы введения, принимая во внимание данное описание. «Введение» или «путь введения» - это доставка субъекту композиции, описанной в настоящем документе, с фармацевтическим носителем или вспомогательным веществом, либо без них. Пути введения при желании можно комбинировать. В некоторых вариантах осуществления введение периодически повторяют. Фармацевтические композиции, описанные в 40 настоящем документе, разработаны для доставки нуждающимся в этом субъектам с помощью любого подходящего пути или комбинации различных путей. Непосредственная доставка в глаз (необязательно путем внутрглазной доставки, интракретинальной инъекции, интравитреальным, местным путем) или доставка через 45 системные пути, ноиргшервнутриартериальный, внутрглазной, внутривенный, внутримышечный, подкожный, внутрикожный и другие пути парентерального введения. Молекулы нуклеиновой кислоты и/или векторы, описанные в настоящем документе, могут быть доставлены в одной композиции или множестве композиций. Необязательно, могут быть доставлены два или более различных AAV или множество вирусов [см.,

например, WO 202011/126808 и WO 2013/049493]. В другом варианте осуществления множество вирусов может содержать различные дефектные по репликации вирусы (например, AAV и аденоовирус) отдельно или в комбинации с белками.

Как используется в настоящем документе, термины «лечение» или «лечить»

- 5 определяются как такие, которые охватывают введение субъекту одного или более соединений или композиций, описанных в настоящем документе, с целью облегчения одного или более симптомов заболевания глаз. Таким образом, «лечение» может включать в себя одно или более из снижения вероятности возникновения или прогрессирования заболевания глаз, предотвращения заболевания, снижения тяжести
- 10 симптомов заболевания или замедления их прогрессирования, включая прогрессирование слепоты, устранения симптомов заболевания, задержки возникновения заболевания или мониторинга прогрессирования заболевания, либо эффективности терапии у указанного субъекта.

Как используется в настоящем документе, термин «доза» может относиться к общей

- 15 дозе, доставленной субъекту в процессе лечения, или к количеству, доставленному при введении однократной дозы (или многократной дозы, или дробной дозы).

Фармацевтические вирусные композиции могут быть составлены с такими дозированными единицами, которые будут содержать количество дефектного по репликации вируса, несущего нуклеотидные последовательности, кодирующие RDH12,

- 20 как описано в настоящем документе. Дозы могут быть выражены в геномных копиях (ГК) нуклеотидных последовательностей. Дозы также могут быть выражены в пересчете на вирусные частицы. В одном варианте осуществления подходящая доза находится в диапазоне от около  $1,0 \times 10^6$  ГК или вирусных частиц до около  $1,0 \times 10^{15}$  ГК, включая все целые или дробные значения в этом диапазоне. В одном варианте осуществления композиции составлены с возможностью содержать, или дозы вводятся в количествах, по меньшей мере  $1 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^6$ ,  $3 \times 10^6$ ,  $4 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $6 \times 10^6$ ,  $7 \times 10^6$ ,  $8 \times 10^6$  или  $9 \times 10^6$  ГК на дозу, включая все целые или дробные значения в этом диапазоне. В одном варианте осуществления композиции составлены с возможностью содержать, или дозы вводятся
- 25

- 30 в количествах, по меньшей мере  $1 \times 10^7$ ,  $2 \times 10^7$ ,  $3 \times 10^7$ ,  $4 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $6 \times 10^7$ ,  $7 \times 10^7$ ,  $8 \times 10^7$  или  $9 \times 10^7$  ГК на дозу, включая все целые или дробные значения в этом диапазоне. В одном варианте осуществления композиции составлены с возможностью содержать по меньшей мере

- 35
- 40
- 45
- 50

композиции составлены с возможностью содержать по меньшей мере  $1 \times 10^8$ ,  $2 \times 10^8$ ,  $3 \times 10^8$ ,  $4 \times 10^8$ ,  $5 \times 10^8$ ,  $6 \times 10^8$ ,  $7 \times 10^8$ ,  $8 \times 10^8$  или  $9 \times 10^8$  ГК на дозу, включая все целые или дробные значения в этом диапазоне. В одном варианте осуществления композиции составлены с возможностью содержать по меньшей мере  $1 \times 10^9$ ,  $2 \times 10^9$ ,  $3 \times 10^9$ ,  $4 \times 10^9$ ,  $5 \times 10^9$ ,  $6 \times 10^9$ ,  $7 \times 10^9$ ,  $8 \times 10^9$  или  $9 \times 10^9$  ГК на дозу, включая все целые или дробные значения в этом диапазоне. В другом варианте осуществления композиции составлены с возможностью содержать по меньшей мере  $1 \times 10^{10}$ ,  $2 \times 10^{10}$ ,

$3 \times 10^{10}$ ,  $4 \times 10^{10}$ ,  $5 \times 10^{10}$ ,  $6 \times 10^{10}$ ,  $7 \times 10^{10}$ ,  $8 \times 10^{10}$  или  $9 \times 10^{10}$  ГК на дозу, включая все целые или дробные значения в этом диапазоне. В другом варианте осуществления композиции составлены с возможностью содержать по меньшей мере  $1 \times 10^{11}$ ,  $2 \times 10^{11}$ ,  $3 \times 10^{11}$ ,  $4 \times 10^{11}$ ,

$5 \times 10^{11}$ ,  $6 \times 10^{11}$ ,  $7 \times 10^{11}$ ,  $8 \times 10^{11}$  или  $9 \times 10^{11}$  ГК на дозу, включая все целые или дробные значения в этом диапазоне. В другом варианте осуществления композиции составлены с возможностью содержать по меньшей мере  $1 \times 10^{12}$ ,  $2 \times 10^{12}$ ,  $3 \times 10^{12}$ ,  $4 \times 10^{12}$ ,  $5 \times 10^{12}$ ,

$6 \times 10^{12}$ ,  $7 \times 10^{12}$ ,  $8 \times 10^{12}$  или  $9 \times 10^{12}$  ГК на дозу, включая все целые или дробные значения

в этом диапазоне. В другом варианте осуществления композиции составлены с возможностью содержать по меньшей мере  $1 \times 10^{13}$ ,  $2 \times 10^{13}$ ,  $3 \times 10^{13}$ ,  $4 \times 10^{13}$ ,  $5 \times 10^{13}$ ,  $6 \times 10^{13}$ ,  $7 \times 10^{13}$ ,  $8 \times 10^{13}$  или  $9 \times 10^{13}$  ГК на дозу, включая все целые или дробные значения в этом диапазоне. В другом варианте осуществления композиции составлены с возможностью содержать по меньшей мере  $1 \times 10^{14}$ ,  $2 \times 10^{14}$ ,  $3 \times 10^{14}$ ,  $4 \times 10^{14}$ ,  $5 \times 10^{14}$ ,  $6 \times 10^{14}$ ,  $7 \times 10^{14}$ ,  $8 \times 10^{14}$  или  $9 \times 10^{14}$  ГК на дозу, включая все целые или дробные значения в этом диапазоне. В другом варианте осуществления композиции составлены с возможностью содержать по меньшей мере  $1 \times 10^{15}$ ,  $2 \times 10^{15}$ ,  $3 \times 10^{15}$ ,  $4 \times 10^{15}$ ,  $5 \times 10^{15}$ ,  $6 \times 10^{15}$ ,  $7 \times 10^{15}$ ,  $8 \times 10^{15}$  или  $9 \times 10^{15}$  ГК на дозу, включая все целые или дробные значения в этом диапазоне. В одном варианте осуществления с целью применения для человека доза может варьироваться от  $1 \times 10^6$  до около  $1 \times 10^{13}$  ГК на дозу, включая все целые или дробные значения в этом диапазоне. В одном варианте осуществления с целью применения для человека доза может варьироваться от  $1 \times 10^{10}$  до около  $1 \times 10^{12}$  ГК на дозу, включая все целые или дробные значения в этом диапазоне. Лечащий врач может определить и другие дозы и дозировки.

Эти указанные выше дозы могут вводиться в различных объемах носителей, вспомогательных веществ или буферных составов в диапазоне от около 25 до около 1000 микролитров, включая все числа в этом диапазоне, в зависимости от размера области, предназначенной для обработки, используемого вирусного титра, пути введения и желаемого воздействия способа. В одном варианте осуществления объем носителя, вспомогательного вещества или буфера составляет по меньшей мере около 25 мкл. В одном варианте осуществления объем составляет около 50 мкл. В другом варианте осуществления объем составляет около 75 мкл. В другом варианте осуществления объем составляет около 100 мкл. В другом варианте осуществления объем составляет около 125 мкл. В другом варианте осуществления объем составляет около 150 мкл. В другом варианте осуществления объем составляет около 175 мкл. В еще одном варианте осуществления объем составляет около 200 мкл. В другом варианте осуществления объем составляет около 225 мкл. В еще одном варианте осуществления объем составляет около 250 мкл. В еще одном варианте осуществления объем составляет около 275 мкл. В еще одном варианте осуществления объем составляет около 300 мкл. В еще одном варианте осуществления объем составляет около 325 мкл. В другом варианте осуществления объем составляет около 350 мкл. В другом варианте осуществления объем составляет около 375 мкл. В другом варианте осуществления объем составляет около 400 мкл. В другом варианте осуществления объем составляет около 450 мкл. В другом варианте осуществления объем составляет около 500 мкл. В другом варианте осуществления объем составляет около 550 мкл. В другом варианте осуществления объем составляет около 600 мкл. В другом варианте осуществления объем составляет около 650 мкл. В другом варианте осуществления объем составляет около 700 мкл. В другом варианте осуществления объем составляет от около 700 до 1000 мкл.

В одном варианте осуществления вирусные конструкции могут доставляться в концентрациях от по меньшей мере  $1 \times 10^6$  до около по меньшей мере  $1 \times 10^{11}$  ГК в объемах от около 1 мкл до около 3 мкл для мелких животных, таких как мыши. Для более крупных животных с размером глаз почти таким же, как глаза человека, используются большие человеческие дозы и объемы, указанные выше, например от  $1 \times 10^6$  до около  $1 \times 10^{15}$  ГК на дозу. Обсуждение надлежащей практики введения субстанций различным

животным см., например, у Diehl et al, J. Applied Toxicology, 21:15-23 (2001). Этот документ включен в настоящий документ посредством ссылки.

Предпочтительно, чтобы использовалась наименьшая эффективная концентрация вируса или другого средства доставки, чтобы снизить риск возникновения

- 5 нежелательных эффектов, таких как токсичность, дисплазия и отслоение сетчатки. В одном варианте осуществления если кодон-оптимизированные последовательности являются более эффективными, чем встречающиеся в природе последовательности у людей, ожидается, что будут применяться более низкие дозы, указанные выше. Однако лечащий врач может выбрать другие дозы в этих диапазонах, учитывая физическое
- 10 состояние субъекта, предпочтительно человека, получающего лечение, возраст субъекта, конкретное заболевание глаз (например, RDH12-опосредованное нарушение) и степень, до которой в случае прогрессирования развилось заболевание.

Другие аспекты, описанные в настоящем документе, представляют собой различные способы лечения RDH12-опосредованного нарушения или заболевания глаз путем

- 15 введения кодон-оптимизированной ДНК RDH12, векторов, вирусов или других фармацевтических композиций, содержащих их. В другом варианте осуществления предлагается способ предотвращения, лечения, прекращения прогрессирования или ослабления потери зрения вследствие описанных выше болезней глаз и изменений сетчатки, связанных с ними. Были разработаны и другие способы для частичного или
- 20 полного восстановления зрения или остроты зрения у субъекта с заболеванием глаз. Потеря зрения, связанная с ВАЛ или ПДС, относится к любому ухудшению периферического зрения, центрального зрения (при чтении), ночного зрения, дневного зрения, к потере восприятия цвета, потере контрастной чувствительности или снижению остроты зрения. К другим проблемам со зрением, которые могут лечиться с помощью
- 25 описанных способов, относится светобоязнь и нистагм.

В целом, эти способы включают в себя введение нуждающемуся в этом млекопитающему эффективного количества композиции, содержащей рекомбинантный адено-ассоциированный вирус (AAV), несущий нуклеотидную последовательность, кодирующую нормальный или функциональный белок RDH12 или его фрагмент, под

- 30 контролем регуляторных последовательностей, которые экспрессируют продукт гена в глазных клетках субъекта, и фармацевтически приемлемый носитель.

В одном варианте осуществления такой способ разработан для лечения, замедления или остановки прогрессирования слепоты у млекопитающего, страдающего от одной или более болезней глаз, описанных выше, таких как ВАЛ или ПДС. rAAV, несущий

- 35 оптимизированную последовательность, кодирующую RDH12, или другую последовательность функционального RDH12, предпочтительно супензированный в физиологически совместимом носителе, разбавителе, вспомогательном веществе и/или адьюванте, может вводиться требуемому субъекту, включая, помимо прочего, кошку, собаку или другое животное, отличное от человека. Этот способ включает в себя
- 40 введение нуждающемуся в этом субъекту любого из: нуклеотидных последовательностей, экспрессионных кассет, геномов rAAV, плазмид, векторов или векторов rAAV, либо содержащих их композиций. В одном варианте осуществления композицию вводят субретинально. В другом варианте осуществления композицию вводят интравитреально. В еще одном варианте осуществления композицию вводят с помощью комбинации
- 45 путей введения, подходящих для лечения заболеваний глаз, при этом введение также может включать в себя введение через вену века или другие внутривенные или традиционные пути введения.

Для использования в этих способах объем и вирусный титр каждой дозы определяют

индивидуально, как будет дополнительно описано в настоящем документе, и они могут быть аналогичными или отличаться от других видов лечения, проводимых для этого же или контралатерального глаза. В другом варианте осуществления лечение проводят с однократным большим объемом, чтобы обработать весь глаз. Дозы, пути введения и режимы лечения могут определяться лечащим врачом, учитывая идеи настоящего описания.

В одном варианте осуществления композицию вводят в однократной дозе, выбранной из описанных выше доз, в один пораженный глаз. В другом варианте осуществления композицию вводят в однократной дозе, выбранной из описанных выше доз, в оба пораженных глаза одновременно или последовательно. Последовательное введение может подразумевать временной промежуток между введением в один глаз и в другой, с интервалами минуты, часы, дни, недели или месяцы. В другом варианте осуществления способ включает в себя введение композиций в глаз в двух или более дозах (например, в дробных дозах).

В еще одном варианте осуществления композиции, описанные в настоящем документе, могут быть доставлены в одной композиции или множестве композиций. Необязательно, могут быть доставлены два или более различных AAV или множество вирусов [см., например, WO 2011/126808 и WO 2013/049493]. В другом варианте осуществления множество вирусов может содержать различные дефектные по репликации вирусы (например, AAV и аденоовирус).

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения желательно проведение неинвазивной визуализации и функциональных исследований сетчатки для идентификации зон палочковых и колбочковых фоторецепторов, на которые будет нацелена терапия. В этих вариантах осуществления применяются клинические диагностические тесты, чтобы определить точное(-ые) место(-а) для одной или более субретинальных инъекций. Эти тесты могут включать в себя электроретинографию (ЭРГ), периметрию, топографическое картирование слоев сетчатки и измерение толщины ее слоев посредством конфокальной лазерной сканирующей офтальмоскопии (КСЛО) и оптической когерентной томографии (ОКТ), топографическое картирование плотности колбочек с помощью адаптивной оптики (АО), функциональную проверку зрения и т.д. в зависимости от вида субъекта, получающего лечение, его физиологического состояния и состояния здоровья, а также от дозы. Учитывая визуализацию и функциональные исследования, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения в один и тот же глаз выполняют одну или более инъекций для нацеливания на разные области пораженного глаза. Объем и вирусный титр каждой инъекции определяют индивидуально, как будет дополнительно описано ниже, и они могут быть аналогичными или отличаться от других инъекций, выполняемых в этот же или контралатеральный глаз. В другом варианте осуществления выполняют однократную инъекцию большего объема, чтобы обработать весь глаз. В одном варианте осуществления объем и концентрацию композиции гAAV выбирают таким образом, чтобы была затронута только область поврежденных палочковых и колбочковых рецепторов. В другом варианте осуществления объем и/или концентрация композиции гAAV будет больше, чтобы затронуть более значительные участки глаза, включая неповрежденные фоторецепторы.

В одном варианте осуществления способов, описанных в настоящем документе, разовая внутриглазная доставка композиции, такая как описанные в настоящем документе, например AAV-доставка оптимизированной кассеты RDH12, применяется для предотвращения потери зрения и слепоты у миллионов индивидов, пораженных

такими заболеваниями глаз или мультисистемными заболеваниями вне зависимости от генотипа или воздействия окружающей среды.

Таким образом, в одном варианте осуществления композицию вводят перед возникновением заболевания. В другом варианте осуществления композицию вводят

5 до развития нарушений или потери зрения. В другом варианте осуществления композицию вводят после развития нарушений или потери зрения. В еще одном варианте осуществления композицию вводят, когда функционирует или осталось менее чем 90% палочек и/или колбочек или фоторецепторов по сравнению с непораженным заболеванием глазом.

10 В другом варианте осуществления способ включает в себя проведение дополнительных исследований, например функциональных и визуализирующих исследований, для определения эффективности лечения. Для исследования у животных такие тесты включают в себя оценку функционирования сетчатки и зрения с помощью электроретинограмм (ЭРГ), которые изучают функцию палочковых и колбочных 15 фоторецепторов, оптоакустический нистагм, pupillometriю, тест водного лабиринта, гистологический тест на предпочтение света или тьмы (толщина сетчатки, ряды ядер во внешнем ядерном слое, иммунофлуоресценция для документирования экспрессии трансгена, подсчет количества колбочных фоторецепторов, окрашивание срезов сетчатки агглютинином арахиса, что позволяет идентифицировать оболочки 20 колбочных фоторецепторов). Другими подходящими тестами эффективности является получение образцов жидкости передней камеры для документирования присутствия трансгенных белков RDH12.

Специально для субъектов-людей после введения дозы композиций, описанных в данном описании, субъект тестируется на эффективность лечения с помощью 25 электроретинограмм (ЭРГ) для изучения функции палочковых и колбочных фоторецепторов, pupillometрического исследования для оценки остроты зрения, теста на цветовое зрение для оценки контрастной чувствительности, тестирования поля зрения (поля зрения по Хамфри/поля зрения по Гольдману), теста периметрической подвижности (полоса препятствий) и теста на скорость чтения. Другими пригодными 30 для использования послелечебными тестами на эффективность, которым подвергается субъект после лечения фармацевтической композицией, описанной в настоящем документе, является функциональная магнитно-резонансная томография (фМРТ), тестирование на светочувствительность полного поля, исследования структуры сетчатки, включая оптическую когерентную томографию, фотографирование глазного дна, 35 аутофлуоресценция глазного дна, сканирование с помощью адаптивной оптики и/или лазерная офтальмоскопия. Эти и другие тесты на эффективность описаны в патенте США №8147823; одновременно находящейся на рассмотрении публикации международной заявки на патент WO 2014/011210 или WO 2014/124282, включенных посредством ссылки.

40 В еще одном варианте осуществления любой из описанных выше способов проводится в комбинации с другой, или вторичной, терапией. В еще одних вариантах осуществления способы лечения этих болезней глаз включают в себя лечение субъекта композицией, подробно описанной в настоящем документе, в комбинации с другой терапией, такой как лечение антибиотиками, паллиативное лечение боли и т.п. Дополнительная терапия 45 может быть любой известной или еще не известной терапией, которая помогает предотвращать, сдерживать или облегчать эти мутации или дефекты, либо любые эффекты, связанные с ними. Вторичная терапия может проводиться до, одновременно или после введение композиций, описанных выше. В одном варианте осуществления

вторичная терапия включает в себя неспецифические подходы для поддержания здоровья клеток сетчатки, такие как введение нейротрофических факторов, антиоксидантов, антиапоптических агентов. Неспецифические подходы достигаются путем инъекции белков, рекомбинантной ДНК, рекомбинантных вирусных векторов, стволовых клеток, ткань плода или генетически модифицированных клеток. Последние могут включать в себя генетически модифицированные клетки, которые являются инкапсулированными.

В другом варианте осуществления изобретение предлагает способ предотвращения, или сдерживания потери функции фоторецепторов, или повышения функционирования фоторецепторов у субъекта. Функция фоторецепторов может оцениваться с помощью

функциональных исследований, описанных выше и в примерах ниже, например ЭРГ или периметрия, которые являются традиционными в данной области техники. Как используется в настоящем документе, «потеря функции фоторецепторов» означает снижение функционирования фоторецепторов по сравнению с нормальным непораженным заболеванием глазом или тем же глазом в более ранний момент времени.

Как используется в настоящем документе, «повышение функции фоторецепторов» означает улучшение функционирования фоторецепторов или повышение количества или процента функциональных фоторецепторов по сравнению с больным глазом (с аналогичной болезнью глаз), этим же глазом в более ранний момент времени, необработанной частью этого же глаза или контралатеральным глазом одного и того же пациента.

В другом аспекте изобретение предлагает способ улучшения структуры фоторецепторов у субъекта. Как используется в настоящем документе, «улучшение структуры фоторецепторов» относится (в области сетчатки, которая подвергается лечению) к одному или более из увеличения или снижения толщины наружного ядерного слоя (НЯС), или сдерживания прогрессирования утолщения или утончения НЯС, по всей сетчатке, в центральной части сетчатки или на периферии; увеличения или снижения толщины внешнего плексиформного слоя (ВПС), или сдерживания прогрессирования утолщения или утончения ВПС, по всей сетчатке, в центральной части сетчатки или на периферии; снижения сокращения внутреннего сегмента (IS) палочек и колбочек; снижения сокращения и потери внешних сегментов (OS); снижения сжатия дендритов биполярных клеток или увеличения длины или количества дендритов биполярных клеток; а также обратимости нарушения расположения опсина.

В другом аспекте в изобретении предлагается способ предотвращения ВАЛ, связанного с RDH12, у субъекта, находящегося в группе риска развития указанного заболевания. К субъектам, находящимся в группе риска развития этого заболевания глаз, относятся субъекты с семейным анамнезом ВАЛ и субъекты с одной или более подтвержденных мутаций гена RDH12.

Для каждого из описанных способов может осуществляться лечение с целью предотвращения появления повреждения сетчатки или сохранения глаз с заболеванием легкой степени или заболеванием на поздней стадии. Как используется в настоящем документе, термин «сохранение» означает предотвращение прогрессирования заболевания до полной слепоты, предотвращение распространения повреждения на непораженные фоторецепторные клетки или улучшение повреждения пораженных фоторецепторных клеток. Таким образом, в одном варианте осуществления композицию вводят перед возникновением заболевания. В другом варианте осуществления композицию вводят после начала нарушения расположения опсина. В другом варианте осуществления композицию вводят до начала потери фоторецепторов. В другом варианте осуществления композицию вводят после начала потери фоторецепторов. В

еще одном варианте осуществления композицию вводят, когда функционирует или осталось менее чем 90% фоторецепторов по сравнению с непораженным заболеванием глазом. В другом варианте осуществления композицию вводят, когда функционирует или осталось менее чем 80% фоторецепторов. В другом варианте осуществления 5 композицию вводят, когда функционирует или осталось менее чем 70% фоторецепторов. В другом варианте осуществления композицию вводят, когда функционирует или осталось менее чем 60% фоторецепторов. В другом варианте осуществления композицию вводят, когда функционирует или осталось менее чем 50% фоторецепторов. В другом варианте 10 осуществления композицию вводят, когда функционирует или осталось менее чем 40% фоторецепторов. В другом варианте осуществления композицию вводят, когда функционирует или осталось менее чем 30% фоторецепторов. В другом варианте осуществления 15 композицию вводят только в один или более участков глаза, например в те участки, где остались фоторецепторы. В другом варианте осуществления композицию вводят в весь глаз.

В другом варианте осуществления предлагается способ лечения или предотвращения ВАЛ или ПДС, связанных с RDH12, у нуждающегося в этом субъекта. Способ включает 20 в себя идентификацию субъекта с ВАЛ или ПДС, связанных с RDH12, или субъекта, находящегося в группе риска развития этих заболеваний; проведение анализа генотипа и идентификацию по меньшей мере одной мутации гена RDH12; проведение неинвазивной визуализации и функциональных исследований сетчатки и идентификацию зон с остаточными фоторецепторами, на которые будет нацелена терапия; а также введение 25 субъекту эффективной концентрации композиции, причем ВАЛ или ПДС, связанные с RDH12, предотвращаются, прекращаются или облегчаются. Композиция содержит рекомбинантный вирус, несущий нуклеотидную последовательность, кодирующую нормальный ген, специфический к фоторецепторным клеткам, под контролем промоторной последовательности, которая экспрессирует продукт гена в 30 фоторецепторных клетках, и фармацевтически приемлемый носитель. Анализ генотипа является стандартным в данной области техники и может включать в себя использование ПЦР для определения одной или более мутаций в нуклеотидной последовательности гена RDH12. См., например, Meindl et al, Nat Gen, May 1996, 13:35, Vervoort, R. et al, 2000. Nat Genet 25(4): A62-A66 (цитированный выше); а также Vervoort, R. and Wright, A.F. 35 2002. Human Mutation 19: 486-500, каждый из которых включен в настоящий документ посредством ссылки.

Следующие примеры описывают конкретные варианты осуществления нуклеотидных последовательностей, экспрессионных кассет, генома гAAV и вирусных векторов для использования при лечении болезней глаз, указанных в настоящем документе. Эти 40 конкретные варианты осуществления иллюстрируют различные аспекты настоящего изобретения. Эти примеры должны восприниматься как охватывающие любые и все варианты, которые станут очевидными в результате идей, представленных в настоящем документе.

Представленные ниже примеры установили подтверждение концепции терапии, 45 предполагающей добавление гена, у мышей с нокаутом гена RDH12 (RDH12 -/-) и в клетках HEK293. Было продемонстрировано, что экспрессия кодон-оптимизированной кДНК в клетках HEK293 на 20% выше, чем у гена дикого типа. Описаны провирусные плазмидные оставы с модификациями, по существу как в WO 2012/158,757, однако с

отличной спайсерной последовательностью (полученной из фага лямбда).

Последовательность, кодирующая RDH12, является кодон-оптимизированной, позволяя более эффективную экспрессию. Кроме того, авторы включили как нативную, так и кодон-оптимизированную последовательности hRDH12 в плазмидную конструкцию и продемонстрировали результаты эффективности *in vitro* и *in vivo*.

Для провирусных плазмид получают данные подтверждения концепции, данные по безопасности и доклинической токсичности и в конечном итоге клинические исследования на людях для пациентов с RDH12-заболеванием. Изобретение, описанное в настоящем документе, включает в себя новые оптимизированные кДНК ретинол-дегидрогеназы 12 (RDH12), которые кодируют функциональный белок RDH12. В одном варианте осуществления кодон-оптимизированная кДНК разработана для лечения ВАЛ-13. Трансгенные кассеты оптимизированы с помощью генной инженерии, и поскольку различные последовательности нуклеотидов в кодоне могут кодировать одну и ту же аминокислоту, нуклеотидную последовательность можно изменять, но все равно будет получен один и тот же белковый продукт. Другими словами, можно извлечь пользу из множества «синонимичных» кодонов для получения одного и того же белкового продукта.

Дополнительные эксперименты также проводятся в индуцированных плюрипотентных стволовых клетках (иПк), полученных от пациентов с RDH12-заболеванием. Эти данные в значительной степени указывают на клиническую значимость и пригодность провирусных плазмид, упакованных в векторах AAV, в качестве способа лечения RDH12-индуцированных заболеваний глаз. Кроме того, модели *in vitro*, такие как клетки HEK293 и иПС клетки, пригодны для проведения тестирования активности этих векторов.

#### **ПРИМЕР 1. КОДОН-ОПТИМИЗИРОВАННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ RDH12**

Кодон-оптимизированная нуклеотидная последовательность, кодирующая функциональный RDH12, SEQ ID NO: 3 была получена путем модификации природной последовательности RDH12 человека, добавлением полного консенсуса Козак на 5' конце, помещенном в сайт NotI, и добавлением сайтов Bell и BamHI на 3' конце (сайты рестрикции для клонирования). Стоп-кодон TGA помещали на сайт Bell для обеспечения оптимальной эпитопной маркировки. В этом варианте осуществления также избегают использования некоторых рестрикционных ферментов, указанных выше.

Открытая рамка считывания (ОРС) кодон-оптимизированной SEQ ID NO: 3 отличается от нативной последовательности на 22%, т.е. она имеет только 78% идентичности с нативным hRDH12, как показано на ФИГ. 1А-1В.

#### **ПРИМЕР 2. КОНСТРУКЦИЯ AAV, ЭКСПРЕССИРУЮЩЕГО RDH12**

Авторы получили провирусные цис-плазмиды адено-ассоциированного вируса, содержащие нативную кДНК RDH12 человека с меткой түе и без нее на основе остова p618 (см. патент США №9249425, включенный в настоящий документ посредством ссылки для последовательностей, используемых в p618). В этих провирусных плазмидах кДНК hRDH12 управляет конститутивным промотором CMV.CβA (CBAe), т.е. pAAV.CMVe.native-hR.DH12 и AAV.CBAe.h-native RDH12.myc.

Как описано в патенте США №9249425, провирусные плазмиды также содержат 5' последовательность ITR AAV, причем ITR фланкируется выше сайтом 1 рестрикции и ниже сайтом 2 рестрикции; (b) промотор, фланкированный выше сайтом 2 рестрикции и ниже сайтом 3 рестрикции; (c) полилинкерную последовательность, содержащую сайт 3 рестрикции, сайт 4 рестрикции и сайт 5 рестрикции. В одном варианте осуществления, описанном в настоящем документе, трансген, содержащий кодон-оптимизированную

нуклеотидную последовательность, которая кодирует RDH12, расположен между любыми двумя из сайтов 3, 4 или 5 рестрикций без их модификаций, причем трансген функционально соединен с промотором и находится под его регулирующим контролем; (d) последовательность полиаденилирования, фланкованную выше сайтом 4 или 5 5 рестрикций и ниже сайтом 6 рестрикций; а также (e) 3' последовательность ITR AAV, фланкованную выше сайтом 6 рестрикций и ниже сайтом 7 рестрикций. Каждый сайт 1-7 рестрикций присутствует только один раз в плазмиде и расщепляется отдельным ферментом, который не расщепляет другой сайт рестрикции в плазмиде. Сайты 1-7 рестрикции расположены таким образом, чтобы обеспечивать независимое и 10 многократное удаление, замещение или замену одного или более элементов (a), (b), (c), (d) и (e) или всего генома AAV (a)-(e) из плазмиды. Такая провирусная плазмода дополнительно содержит плазмидный остаток, содержащий элементы, необходимые для 15 репликации в бактериальных клетках, и ген устойчивости. В другом варианте осуществления плазмидный остаток содержит одно или более из: (a) 5' и 3' транскрипционных терминаторных/инсуляторных последовательностей, которые отделяют транскрипцию в остатке от транскрипции в модульном геноме рекомбинантного AAV; или (b) некодирующую спейсерную последовательность, которая увеличивает длину остатка и предотвращает обратное упаковывание нефункциональных геномов AAV. Эти трансгенные кассеты совместимы с грузовместимостью векторов 20 AAV. Конструкции были верифицированы с помощью рестрикционного картирования и анализа секвенирования ДНК.

См., например, схематические графические материалы AAV.CBAe.h-Native-RDH12, AAV.CBAe.h-Native RDH12-Mys и AAV.CBAe.h-codon opt-RDH12 на ФИГ. 10A-10C, соответственно.

Чтобы подтвердить экспрессию человеческого белка RDH12 дикого типа (нативный), 25 кодируемого в провирусной конструкции, клетки COS-7 трансфицировали с помощью рAAV-CMVe -native-hRDH12.myc. Трансфицированные клетки подвергали иммунофлуоресцентному анализу и анализу вестерн-блоттинга с использованием антител, специфичных к метке тью.

Клетки затем окрашивали и изучали электроскопическим путем, чтобы 30 продемонстрировать успешную трансфекцию и эффективность переноса генов. Иммунофлуоресцентный анализ клеток, трансфицированных с помощью рAAV.CMVe.native-hRDH12.myc, продемонстрировал экспрессию белка RDH12 только в трансфицированных клетках. На ФИГ. 2А-2F показаны 6 панелей, показывающих 35 экспрессию RDH12 в клетках. На ФИГ. 2А-2В показан нетрансфицированный контроль; на ФИГ. 2С-2D показаны трансфицированные клетки RDH12Mys; на ФИГ. 2Е показаны трансфицированные клетки RDH12Mys; ФИГ. 2F представляет собой увеличение двух клеток, показанных на ФИГ. 2D.

Анализ вестерн-блоттинга дополнительно подтвердил экспрессию человеческого 40 белка RDH12 ожидаемого размера в трансфицированных клетках, причем в контрольных нетрансфицированных клетках никакой полосы не наблюдалось. На ФИГ. 2G представлен гель, демонстрирующий трансфицированные RDH12Mys клетки COS-7, контрольные клетки COS-7, трансфицированные RDH12Mys клетки CHO, контрольные клетки CHO и два маркера молекулярной массы (ФИГ. 2G).

Затем использовали провирусные плазмиды рAAV.CMVe.native-hRDH12 и 45 рAAV.CMVe.native-hRDH12.myc для получения векторов на основе серотипа рекомбинантного AAV (AAV2, AAV8 и AAV7m8), используя метод тройной трансфекции, включающий трансфекцию субконфлюэнтных клеток HEK293 с помощью трех плазмид:

цис-плазмиды AAV, кодирующей представляющий интерес ген, транс-плазмиды AAV, содержащей гер- и сар-гены AAV, и хелперной плазмиды аденоовириуса, получая, таким образом, AAV8-RDH12, AAV2-RDH12 и AAV7m8-RDH12.

Если описывать кратко, экспрессионные кассеты AAV8-RDH12-мус или AAV7m8-

- 5 RDH12-мус отдельно упаковывают в выбранном капside AAV путем культивирования упаковывающей клетки, несущей плазмиду, в присутствии достаточных вирусных последовательностей, чтобы обеспечить заключение генома AAV в оболочку или капсид инфекционного AAV. В одном варианте осуществления способ получения гAAV включает в себя упаковку в линии упаковывающих клеток-хозяев млекопитающего,
- 10 экспрессирующих стабильные гер и сар (таких как B-50, как описано в публикации международной заявки на патент № WO 99/15685) с ДНК аденоовириуса E1, E2a и E4ORF6. Очистка на градиенте йодиксанола или центрифугирование в градиенте плотности йодиксанола используется для отделения содержащих ДНК вирусных частиц, от пустых частиц. Затем следует колоночная хроматография на гепарин-сефарозе и агарозе. Титры
- 15 вектора определяют с помощью анализа инфекционных центров. Векторный геном определяют путем окрашивания серебром по сравнению с установленной эталонной партией. Чистоту векторов еще раз оценивают по прозрачности геля вестерн-блоттинга. Вирусные препараты готовят и объединяют для получения желаемого общего объема.

Другие способы получения таких частиц гAAV включают в себя использование линии

- 20 упаковывающих клеток насекомых, таких как описано у Smith et al, ref 11, процитированном ниже.

Вирусные частицы гAAV сусpendируют в подходящем вспомогательном веществе, таком как 180 mM NaCl, 10 mM NaPi, pH 7,3, содержащем 0,0001%-0,01% Плюроник F68 (PF68). Композиция солевого компонента находится в диапазоне от 160 mM до 180 25 mM NaCl. В таких композиция могут использоваться и другие буферы, включая НЕРEs, бикарбонат натрия, TRIS или 0,9% раствор NaCl.

Несколько препаратов гAAV объединяют для получения желаемого общего объема. В одном варианте осуществления общий объем представляет собой дозу  $1\times10^{11}$  ГК в объеме 300 микролитров буфера. В другом варианте осуществления общий объем 30 30 представляет собой дозу  $1\times10^8$  ГК в объеме 300 микролитров буфера. В еще одном варианте осуществления общий объем представляет собой дозу от  $1\times10^6$  до  $1\times10^{13}$  ГК в объеме 300 микролитров буфера. Предполагается, что контаминирующий хелперный аденоовириус и нативный AAV, проанализированные путем цитопатического действия в 35 серийных разведениях или анализа инфекционных центров, соответственно, будут меньше на один или множество порядков величины, чем для вектора AAV.

### ПРИМЕР 3. иПСК В КАЧЕСТВЕ МОДЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ

Последние достижения в области пациент-специфических индуцированных 40 плюрипотентных стволовых клеток (иПСК) обеспечивают подходящую модельную систему *in vitro* для изучения патогенеза заболеваний. Чтобы разработать модель *in vitro* для изучения функционирования RDH12, от пациента-человека RDH12 были получены и охарактеризованы иПС клетки. Для подтверждения того факта, что инфицирование AAV2.CMV.C $\beta$ A-native-hRDH12 приведет к выработке экзогенного RDH12, авторы трансдудировали аликвоты иПС клеток с помощью AAV2 CMV.C $\beta$ A-45 native-hRDH12 по  $1\times10^3$ ,  $1\times10^4$ ,  $1\times10^5$  или  $2\times10^5$ ,  $3\times10^5$  векторных геномов (вГ)/клетку. Через сорок восемь часов были собраны клеточные лизаты и проанализированы методом вестерн-блоттинга, используя антитела, специфические к метке тире. В трансдудированных клеточных лизатах наблюдалась четкая дозозависимая выработка

человеческого RDH12. Результаты см. на ФИГ. 4.

В другом *in vitro* эксперименте рекомбинантный вирус AAV2-RDH12-Мус затем трансфицировали в иПС клетки с указанной множественностью трансфекции  $1\times10^3$  ГК/клетку,  $1\times10^4$  ГК/клетку,  $1\times10^5$  ГК/клетку,  $2\times10^5$  ГК/клетку и  $3\times10^5$  ГК/клетку. Показан также положительный контроль. Экспрессия была подтверждена, как показано на ФИГ. 3.

#### ПРИМЕР 4. СВЕТОВОЕ ПОРАЖЕНИЕ У ЖИВОТНЫХ С НОКАУТИРОВАННЫМ RDH12

Мыши  $Rdh2^{-/-}$  с родословной BALB/c были получены у д-ра Anne Kasus-Jacobi, университет штата Оклахома. Эти животные не демонстрируют человеческий фенотип дегенерации сетчатки при развитии в условиях нормального циклического света, однако у них развивается дегенерация после воздействия яркого света.

Чтобы оценить эффективность терапии, предполагающей добавление гена, у мышей  $RDH12^{-/-}$ , мышам предварительно в один глаз вводили экспериментальные гAAV (AAV8.CMV.C $\beta$ A-native-hRDH12 или AAV7m8.CMV.C $\beta$ A-native-hRDH12) и определяли, защищает ли доставка RDH12 эти пораженные сетчатки от светоиндуцированной дегенерации. Животным в возрасте 1-2 месяца в один глаз субretинально вводили AAV8.CMV.C $\beta$ A-native-hRDH12 или интравитреально вводили AAV7m8.CMV.C $\beta$ A-native-hRDH12. Каждый гAAV вводили в правый глаз мышей с нокаутированным (КО) RDH12 путем инъекции  $10^{11}$ - $10^{13}$  вирусных частиц или  $10^{11}$ - $10^{13}$  вирусных частиц/мл буфера, при этом левый глаз оставался неинфицированным. Через 3-4 недели после инъекции животных подвергали воздействию яркого света (10000 люкс) в течение 4 часов.

Воздействие света на сетчатки этих животных оценивали с помощью исследований функционирования сетчатки (электроретинограмм (ЭРГ) до светового поражения и через 24 часа после него. Сетчатка, подверженная воздействию света, должна демонстрировать признаки светового поражения. На этом этапе животным давали 10-дневный период для восстановления после светового поражения. Затем авторы измеряли функционирование сетчатки с помощью ЭРГ и степень гибели фоторецепторных клеток в срезах ткани сетчатки. Мышей умерщвляли, а глаза собирали для изготовления срезов из замороженных тканей. Криосрезы тканей были окрашены антителом к туе. Мус был неспецифическим. Ядра окрашивали красителем DAPI.

На ФИГ. 5А и 5В показана разница амплитуды а-волны между сетчатками мышей  $RDH12^{-/-}$ , которым выполнили инъекцию AAV8 или AAV7m8. CMV.C $\beta$ A-native-hRDH12 (AAV-RDH12), и нелеченными глазами. Электроретинография (ЭРГ) выявила частичное функциональное сохранение а-волны, которая представляет функцию палочковых фоторецепторов, в сетчатках, обработанных AAV-RDH12, после воздействия света. На ФИГ. 5А представлен график соотношения А-волны в инъецированной RDH12.мус (AAV8-RDH12-Мус) по сравнению с неинъецированной сетчаткой мышей с КО RDH12 (перед засвечиванием и после засвечивания). На ФИГ. 5В представлен график соотношения А-волны перед засвечиванием и после засвечивания в инъецированной RDH12.мус (AAV7m8-RDH12-Мус) по сравнению с неинъецированной сетчаткой мышей КО RDH12.

Глаза, обработанные вектором  $RDH12^{-/-}$ , оценивали на степень гистологического сохранения, которое сопровождало сохранение функционирования фоторецепторов после светового поражения (см. ФИГ. 6-9).

На ФИГ. 7А-7С показано, что архитектура сетчатки сохраняется в сетчатке,

инъецированной AAV7m8-RDH12-Мус, по сравнению с неинъецированной сетчаткой после светового поражения. На ФИГ. 7А показан левый неинъецированный глаз. На ФИГ. 7В показано изображение левого глаза при большем увеличении, демонстрирующее тонкий наружный ядерный слой (НЯС) сетчатки. На ФИГ. 7С показан 5 правый глаз, в который инъецировали AAV7m8-RDH12-Мус.

На ФИГ. 8А показана архитектура сетчатки животного, левый глаз которого не был инъецирован, демонстрирующая тонкую сетчатку. На ФИГ. 8В показан правый глаз животного, в который инъецировали AAV8-RDH12-Мус.

На ФИГ. 9А и 9В показана архитектура сетчатки одного животного 147 в

10 изображениях при большем увеличении. На ФИГ. 9А показан неинъецированный левый глаз. На ФИГ. 9В показан правый глаз, в который инъецировали AAV8-RDH12-Мус.

При небольшом увеличении очевидно, что большинство сетчаток, обработанных 15 RDH12<sup>-/-</sup>, сохраняли относительно нормальный НЯС, тогда как НЯС необработанного глаза этой же мыши содержал лишь незначительное количество клеточных тел фоторецепторов в центральном участке сетчатки. Изображения с большим увеличением показали, что типичная обработанная сетчатка сохраняла значительную толщину наружного ядерного слоя и внешних сегментов. Напротив, в необработанном глазе этой же мыши остались только от одного до трех слоев ядер НЯС с остаточными 20 внешними сегментами в центральной сетчатке.

20 Аналогичные тесты были проведены для подтверждения того факта, что использование оптимизации кодонов в гене RDH12 приводит к повышению уровней экспрессии трансгенов и лучшему сохранению при дегенерации сетчатки. Ожидается, что кодон-оптимизация снижает дозу вируса, необходимую для эффективного восстановления RDH12.

## 25 ПРИМЕР 5. ЭФФЕКТИВНОСТЬ ДЛЯ СУБЪЕКТОВ-ЛЮДЕЙ

Частицы гAAV также используются для трансдукции клеток сетчатки субъекта-человека после введения путем субретинальной инъекции  $10^{10}$ - $10^{12}$  ГК или вирусных частиц в суспензии в подходящем буферном носителе. Экспрессия кодон-оптимизированного hRDH12 в трансдуцированных клетках или сетчатках оценивалась 30 с точки зрения функции сетчатки и зрения.

Эти функции исследуют у людей с помощью одной или более методик: электроретинограмм (ЭРГ) для изучения функции палочковых и колбочковых фоторецепторов, pupillometрического исследования для оценки остроты зрения, теста 35 на цветовое зрение для оценки контрастной чувствительности, тестирования поля зрения (поля зрения по Хамфри/поля зрения по Гольдману), теста периметрической подвижности (полоса препятствий) и теста на скорость чтения. К другим пригодным для использования тестам относится функциональная магнитно-резонансная томография (фМРТ), тестирование на светочувствительность полного поля, исследования структуры 40 сетчатки, включая оптическую когерентную томографию, фотографирование глазного дна, аутофлуоресценция глазного дна, адаптивная оптика и/или сканирующая лазерная офтальмоскопия.

## ТАБЛИЦА 1 (Произвольный текст перечня последовательностей)

Следующая информация предлагается для последовательностей, содержащих произвольный текст под числовым идентификатором <223>.

5	SEQ ID NO: (содержит произвольный текст)	Произвольный текст под <223>
10	3	Кодон-оптимизированная последовательность ДНК RDH12
15	4	Транслированная последовательность функционального белка RDH12 из кодон-оптимизированной нуклеотидной последовательности

Абсолютно все патенты, заявки на патент, включая первичную заявку на патент США 62/359,777, поданную 8 июля 2016 г., и публикации, включая веб-сайты, приведенные по всему данному описанию, включены в настоящий документ посредством ссылки.

Аналогичным образом, SEQ ID NO, ссылки на которые приводятся в настоящем документе и которые появляются в прилагаемом перечне последовательностей, включены посредством ссылки. Настоящее изобретение было описано со ссылками на конкретные варианты его осуществления, однако следует понимать, что могут быть выполнены модификации без отступления от сути настоящего изобретения. Подразумевается, что такие модификации входят в объем прилагаемой формулы изобретения.

## ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

30	<110> ЗЕ ТРАСТИС ОФ ЗЕ ЮНИВЕРСИТИ ОФ ПЕНСИЛЬВАНИЯ	
	<120> СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ НАРУШЕНИЙ И ЗАБОЛЕВАНИЙ, СВЯЗАННЫХ С RDH12	
	<130> UPN-16-7699PCT	
	<150> US 62/359 777	
	<151> 08.07.2016	
35	<160> 4	
	<170> PatentIn версия 3.5	
	<210> 1	
	<211> 949	
	<212> ДНК	
40	<213> Homo sapiens	
	<400> 1	
	atgctggta ccttggact gtcacacctcc ttcttctcggt tcctgtatat ggttagctcca	60
	tccatcagga agttctttgc tggtggagtgc tgtagaaacaa atgtgcagct tcctggcaag	120
	gtagtggta tcactggcgcc caacacgggc attggcaagg agacggccag agagctcgct	180
	agccgaggag cccgagtcta tattgcctgc agagatgtac tgaaggggaa gtctgctgcc	240
45	agtgaaatcc gagtggtatac aaagaactcc caggtgctgg tgccggaaatt ggacctatcc	300
	gacacccaaat ctatccgagc ctttgctgag ggctttctgg cagaggaaaa gcagctccat	360
	attctgatca acaatgcggg agtaatgatg tgtccatatt ccaagacagc tcatggcttt	420

## RU 2764920 C2

	gaaaccacc	tgggagtc	ccacccggc	cacttcctcc	tcacacct	gctcctggag	480											
	cggctaaagg	tgtctgcccc	tgcacgggtg	gttaatgtgt	cctcggtggc	tcaccacatt	540											
	ggcaagattc	ccttccacga	cctccagagc	gagaagcgct	acagcagggg	ttttgcctat	600											
5	tgccacagca	agctggccaa	tgtgctttt	actcgtgagc	tggccaagag	gctccaaggc	660											
	accggggtca	ccacctacgc	agtgcaccca	ggcgtcg	gctctgagct	ggtccggcac	720											
	tcctccctgc	tctgcctgct	ctggcggctc	ttctccccc	ttgtcaagac	ggcacgggag	780											
	ggggcgcaga	ccagcctgca	ctgcgcctg	gctgagggcc	tggagccc	gagtggcaag	840											
	tacttcagt	actgcaagag	gacctgggtg	tctccaaggg	cccgaaataa	caaaacagct	900											
	gagcgcctat	ggaatgtcag	ctgtgagctt	ctaggaatcc	ggtgggag		949											
10	<210>	2																
	<211>	316																
	<212>	Белок																
	<213>	Homo sapiens																
	<400>	2																
15	Met	Leu	Val	Thr	Leu	Gly	Leu	Leu	Thr	Ser	Phe	Phe	Ser	Phe	Leu	Tyr		
	1				5				10						15			
	Met	Val	Ala	Pro	Ser	Ile	Arg	Lys	Phe	Phe	Ala	Gly	Gly	Val	Cys	Arg		
						20				25					30			
	Thr	Asn	Val	Gln	Leu	Pro	Gly	Lys	Val	Val	Val	Ile	Thr	Gly	Ala	Asn		
20						35				40					45			
	Thr	Gly	Ile	Gly	Lys	Glu	Thr	Ala	Arg	Glu	Leu	Ala	Ser	Arg	Gly	Ala		
						50				55					60			
	Arg	Val	Tyr	Ile	Ala	Cys	Arg	Asp	Val	Leu	Lys	Gly	Glu	Ser	Ala	Ala		
						65				70					75		80	
25	Ser	Glu	Ile	Arg	Val	Asp	Thr	Lys	Asn	Ser	Gln	Val	Leu	Val	Arg	Lys		
						85				90					95			
	Leu	Asp	Leu	Ser	Asp	Thr	Lys	Ser	Ile	Arg	Ala	Phe	Ala	Glu	Gly	Phe		
						100				105					110			
	Leu	Ala	Glu	Glu	Lys	Gln	Leu	His	Ile	Leu	Ile	Asn	Asn	Ala	Gly	Val		
30						115				120					125			
	Met	Met	Cys	Pro	Tyr	Ser	Lys	Thr	Ala	Asp	Gly	Phe	Glu	Thr	His	Leu		
						130				135					140			
	Gly	Val	Asn	His	Leu	Gly	His	Phe	Leu	Leu	Thr	Tyr	Leu	Leu	Leu	Glu		
						145				150					155		160	
35	Arg	Leu	Lys	Val	Ser	Ala	Pro	Ala	Arg	Val	Val	Asn	Val	Ser	Ser	Val		
						165				170					175			
	Ala	His	His	Ile	Gly	Lys	Ile	Pro	Phe	His	Asp	Leu	Gln	Ser	Glu	Lys		
						180				185					190			
	Arg	Tyr	Ser	Arg	Gly	Phe	Ala	Tyr	Cys	His	Ser	Lys	Leu	Ala	Asn	Val		
40						195				200					205			
	Leu	Phe	Thr	Arg	Glu	Leu	Ala	Lys	Arg	Leu	Gln	Gly	Thr	Gly	Val	Thr		
						210				215					220			
	Thr	Tyr	Ala	Val	His	Pro	Gly	Val	Val	Arg	Ser	Glu	Leu	Val	Arg	His		
						225				230					235		240	
45	Ser	Ser	Leu	Leu	Cys	Leu	Leu	Trp	Arg	Leu	Phe	Ser	Pro	Phe	Val	Lys		
						245				250					255			
	Thr	Ala	Arg	Glu	Gly	Ala	Gln	Thr	Ser	Leu	His	Cys	Ala	Leu	Ala	Glu		
						260				265					270			

## RU 2764920 C2

Gly Leu Glu Pro Leu Ser Gly Lys Tyr Phe Ser Asp Cys Lys Arg Thr  
                  275                 280                 285  
      Trp Val Ser Pro Arg Ala Arg Asn Asn Lys Thr Ala Glu Arg Leu Trp  
                  290                 295                 300  
      5 Asn Val Ser Cys Glu Leu Leu Gly Ile Arg Trp Glu  
                  305                 310                 315  
      <210> 3  
      <211> 686  
      <212> ДНК  
      10 <213> Искусственная последовательность  
      <220>  
      <223> Кодон-оптимизированная последовательность ДНК RDH12.  
      <400> 3  
      gcccccccca ccatgttggc caccctcgga ctccttacct cattttctc ctccctgtac      60  
      15 atggtcgccc cgagcattag aaagttctc gccggcggag tgtgttaggac taacgtgcag      120  
          ttgcccggga aggtcgtggt gattactggc gccaacactg gtatcgaaaa ggaaactgcg      180  
          cgggaactgg cgtccagagg tgcccgctg tacattgcat gccgcgacgt gctgaaggga      240  
          gaatccgccc cgtccgagat ccgggtggac accaaaaata gccaggtgct cgtgcggaaag      300  
          ctggatctgt ccgacaccaa gtcaatcagg gccttgccg aggggttcct ggctgaagag      360  
      20 aagcagctcc acattctgat caacaacgcc ggggtcatga tgtgccccta ctc当地agacc      420  
          gcagacggct tcgaaaaccca cctggcgctg aaccatctgg gacacttcct gctgaccstat      480  
          ctgctgctgg agcgactgaa agtgtcggct cctgctcggg tcgtgaacgt gtccagcgtg      540  
          gcccatcaca tcggaaagat cccattccac gatctccaat ccgagaagcgt gtacagcagg      600  
          ggcttcgcgt actgtcactc gaagttggcc aacgtgctct ttacccgcga actggccaag      660  
      25 cggctgcagg gcactggcgt gaccac      686  
      <210> 4  
      <211> 320  
      <212> Белок  
      <213> Искусственная последовательность  
      30 <220>  
      <223> Транслированная последовательность функционального белка RDH12.  
      <400> 4  
      Ala Ala Ala Thr Met Leu Val Thr Leu Gly Leu Leu Thr Ser Phe Phe  
          1                 5                 10                 15  
      35 Ser Phe Leu Tyr Met Val Ala Pro Ser Ile Arg Lys Phe Phe Ala Gly  
          20                 25                 30  
          Gly Val Cys Arg Thr Asn Val Gln Leu Pro Gly Lys Val Val Val Ile  
          35                 40                 45  
          Thr Gly Ala Asn Thr Gly Ile Gly Lys Glu Thr Ala Arg Glu Leu Ala  
      40       50                 55                 60  
          Ser Arg Gly Ala Arg Val Tyr Ile Ala Cys Arg Asp Val Leu Lys Gly  
          65                 70                 75                 80  
          Glu Ser Ala Ala Ser Glu Ile Arg Val Asp Thr Lys Asn Ser Gln Val  
          85                 90                 95  
      45 Leu Val Arg Lys Leu Asp Leu Ser Asp Thr Lys Ser Ile Arg Ala Phe  
          100                 105                 110  
          Ala Glu Gly Phe Leu Ala Glu Glu Lys Gln Leu His Ile Leu Ile Asn  
          115                 120                 125

	Asn Ala Gly Val Met Met Cys Pro Tyr Ser Lys Thr Ala Asp Gly Phe			
	130	135	140	
	Glu Thr His Leu Gly Val Asn His Leu Gly His Phe Leu Leu Thr Tyr			
	145	150	155	160
5	Leu Leu Leu Glu Arg Leu Lys Val Ser Ala Pro Ala Arg Val Val Asn			
	165	170	175	
	Val Ser Ser Val Ala His His Ile Gly Lys Ile Pro Phe His Asp Leu			
	180	185	190	
	Gln Ser Glu Lys Arg Tyr Ser Arg Gly Phe Ala Tyr Cys His Ser Lys			
10	195	200	205	
	Leu Ala Asn Val Leu Phe Thr Arg Glu Leu Ala Lys Arg Leu Gln Gly			
	210	215	220	
	Thr Gly Val Thr Thr Tyr Ala Val His Pro Gly Val Val Arg Ser Glu			
	225	230	235	240
15	Leu Val Arg His Ser Ser Leu Leu Cys Leu Leu Trp Arg Leu Phe Ser			
	245	250	255	
	Pro Phe Val Lys Thr Ala Arg Glu Gly Ala Gln Thr Ser Leu His Cys			
	260	265	270	
	Ala Leu Ala Glu Gly Leu Glu Pro Leu Ser Gly Lys Tyr Phe Ser Asp			
20	275	280	285	
	Cys Lys Arg Thr Trp Val Ser Pro Arg Ala Arg Asn Asn Lys Thr Ala			
	290	295	300	
	Glu Arg Leu Trp Asn Val Ser Cys Glu Leu Leu Gly Ile Arg Trp Glu			
	305	310	315	320

25

**(57) Формула изобретения**

1. Нуклеиновая кислота, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 5, кодирующую RDH12 человека.

30 2. Экспрессионная кассета, содержащая SEQ ID NO: 5, кодирующую RDH12 человека, необязательно, в которой указанная кодон-оптимизированная последовательность функционально связана с регулирующими экспрессию последовательностями, которые направляют в клетке-хозяине экспрессию RDH12.

35 3. Экспрессионная кассета рекомбинантного AAV, содержащая последовательности инвертированных концевых повторов AAV, flankирующие экспрессионную кассету, содержащую SEQ ID NO: 5, которая кодирует RDH12, а также регулирующие экспрессию последовательности, которые направляют экспрессию кодируемого RDH12 в клетке-хозяине.

40 4. Плазмида, содержащая экспрессионную кассету по п. 2 или 3 для применения в получении вектора для лечения заболевания глаз.

45 5. Провирусная плазмида, содержащая капсид AAV и экспрессионную кассету, содержащую последовательности инвертированных концевых повторов AAV и нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 5, которая кодирует функциональный RDH12, а также регулирующие экспрессию последовательности, которые направляют экспрессию кодируемого RDH12 в клетке-хозяине для лечения заболевания глаз.

6. Вектор на основе рекомбинантного адено-ассоциированного вируса (AAV), содержащий капсидный белок AAV и нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 5, которая кодирует функциональный RDH12 под контролем регуляторных

последовательностей, которые экспрессируют RDH12 в фоторецепторных клетках субъекта, для лечения заболевания глаз, необязательно, причем гAAV содержит капсид AAV8, капсид AAV7, капсид AAV5, либо капсид AAV2.

7. гAAV по п. 6, в котором гAAV представляет собой самокомплémentарный AAV.

5 8. Клетка-хозяин, содержащая экспрессионную кассету, экспрессионную кассету рекомбинантного AAV или плазмиду, или провирусную плазмиду по любому из пп. 2-5 для применения в получении вектора для лечения заболевания глаз.

9. Композиция, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты, для применения в лечении болезни глаз, где молекула нуклеиновой кислоты содержит SEQ ID NO: 5,

10 которая кодирует функциональный RDH12 под контролем регуляторных последовательностей, которые направляют его экспрессию в глазных клетках; и носитель или вспомогательное вещество, подходящие для доставки в глазные клетки субъекта.

10. Композиция, содержащая фармацевтически приемлемый носитель, подходящий для доставки в глаз, и вирусный вектор, содержащий капсидный белок AAV и

15 нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 5, которая кодирует функциональный RDH12 под контролем регуляторных последовательностей, которые экспрессируют RDH12 в фоторецепторных клетках субъекта.

11. Композиция по п. 9, причем указанные композиции приводят к восстановлению по меньшей мере частичного зрения у указанного субъекта.

20 12. Композиция по п. 9, причем указанную композицию вводят субретинально или интравитреально.

13. Композиция по п. 9, причем указанное заболевание возникает в результате дефицита или мутации гена, кодирующего RDH12.

14. Композиция для применения в лечении врожденного амавроза Лебера типа 13

25 (ВАЛ-13) или пигментной дегенерации сетчатки 53 (ПДС-53), у субъекта, причем указанная композиция содержит рекомбинантный адено-ассоциированный вирус (AAV), несущий нуклеотидную последовательность, включающую SEQ ID NO: 5, кодирующую функциональный белок RDH12 под контролем регуляторных последовательностей, которые экспрессируют RDH12 в фоторецепторных клетках указанного субъекта, и

30 фармацевтически приемлемый носитель,

необязательно причем (i) композицию вводят перед возникновением заболевания или после начала потери фоторецепторов

или (ii) введение композиции повторяют по меньше мере один раз в тот же глаз и/ или в контралатеральный глаз.

35

40

45

**ФИГ. 1А**

SEQ ID NO: 1 над SEQ ID NO: 3

ATGTTGGTCACCCCTGGACTCCTCACCTCATTTTCTCCTCCTGTACATGGTCGCCCCG 72  
 ATGCTGGTCACCTTGGACTGCTCACCTCCTCTCGTCCCTGTATATGGTAGCTCCA 60  
 AGCATTAGAAAAGTTCTCGCCGGAGTGTGTAGGACTAACGTGCAGTTGCCCGGGAAAG  
 TCCATCAGGAAGTTCTTGCTGGTGGAGTGTAGAACAAATGTGCAGCTCCTGGCAAG 120  
 GTCGTGGTGAATTACTGGCGCAAACACTGGTATCGGAAAGGAACTGCGCGGGAACTGGCG  
 GTAGTGGTGAATCACTGGCGCAAACACGGGATTGGCAAGGAGACGGCCAGAGAGCTCGCT 180  
 TCCAGAGGTGCCCGCGTGTACATTGCATGCCGCGACGTGCTGAAGGGAGAATCCGCCCG  
 AGCCGAGGAGCCGAGTCTATATTGCCTGCAGAGATGTACTGAAGGGGAGTCTGCTGCC 240  
 TCCGAGATCCGGTGGACACAAAAATAGCCAGGTGCTCGTGCAGAGCTGGATCTGTCC  
 AGTGAATCCGAGTGGATACAAAGAACCTCCAGGTGCTGGTGCAGAGCTGGACCTATCC 300  
 GACACCAAGTCATCAGGGCTTTGCCGAGGGGTTCTGGCTGAAGAGAAGCAGCTCCAC  
 GACACAAATCTATCCGAGCCTTGCTGAGGGCTTCTGGCAGAGGAAAGCAGCTCCAT 360  
 ATTCTGATCAACAACGCCGGGTATGATGTGCCCTACTCAAAGACCGCAGACGGCTTC  
 ATTCTGATCAACAATGCCGGAGTAATGATGTGTCCATATTCAAGACAGCTGATGGCTTT 420  
 GAAACCCACCTGGCGTGAACCATCTGGACACTTCTGCTGACCTATCTGCTGGAG  
 GAAACCCACCTGGAGTCAACCACCTGGCCACTTCTCCTCCTCACCTACCTGCTGGAG 480

2/15

**ФИГ. 1В**

CGACTGAAAGTGTGGCTCCTGCTCGGGTCGTGAACGTGTCCAGCGTGGCCCATCACATC  
 ||||| ||||| ||||| |||||  
 CGGCTAAAGGTGTCTGCCCTGCACGGGTGGTTAATGTGTCCCTCGTGGCTCACCAACATT 540  
  
 GGAAAGATCCCATTCCACGATCTCCAATCCGAGAACGGTACAGCAGGGCTTCGCGTAC  
 ||||| ||||| ||||| |||||  
 GGCAAGATTCCCTTCCACGACCTCCAGAGCGAGAACGCTACAGCAGGGTTTGCTTAT 600  
  
 TGTCACTCGAAGTTGGCAACGTGCTCTTACCCGGAACCTGGCAAGCGGCTGCAGGGC  
 ||||| ||||| ||||| |||||  
 TGCCACAGCAAGCTGGCCAATGTGCTTTTACTCGTAGCTGGCAAGAGGCTCCAAGGC 660  
  
 ACTGGCGTGACCACCTACGCCGTGCACCCCTGGTGTCTGCGGTCGAGCTGGTCCGCAT  
 ||||| ||||| |||||  
 ACCGGGGTCAACCACCTACGCAGTGACCCAGGCGTCTGAGCTGGTCCGGCAC 720  
  
 TCCCTCTCTCTGTGCCTCTGTGGAGACTCTTCTCCCCGTTCTGCAAGACCGCAAGGGAA  
 ||||| ||||| |||||  
 TCCCTCCCTGCTCTGCCTGCTCTGGCGCTCTTCTCCCCCTTGTCAAGACGGCACGGGAG 780  
  
 GGAGCCCAAACGAGCCTCACTGTGCCCTGGCGAAGGACTGGAGCCGTTAGCGGAAAG  
 ||||| |||||  
 GGGGCGCAGACCAGCCTGCACTGCCCTGGCTGAGGCCCTGGAGCTGGAGCTGGCAAG 840  
  
 TACTTCTCGGACTGCAAGCGCACCTGGGTGTGCGCTAGAGCTCGAACACAAGACTGCC  
 ||||| |||||  
 TACTTCAGTGACTGCAAGAGGACCTGGGTGTCTCAAGGGCCCGAAATAACAAAACAGCT 900  
  
 GAACGCCCTCTGGAATGTGCTCTGCGAGCTGCTGGGAATCAGATGGGAGT 961  
 ||||| |||||  
 GAGCGCCTATGGAATGTCAGCTGTGAGCTTAGGAATCCGGTGGGAGT 949

3/15

ЭКСПРЕССИЯ ПЛАЗМИДЫ RDH12

ФИГ.  
2А



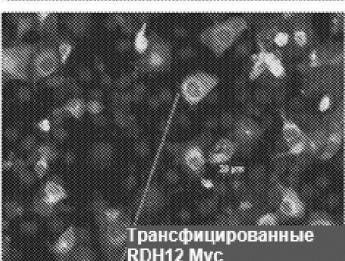
ФИГ. 2В



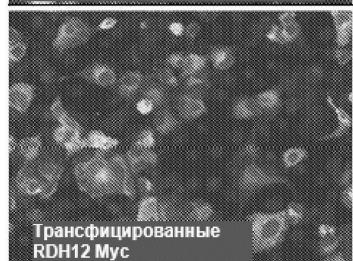
ФИГ.  
2С



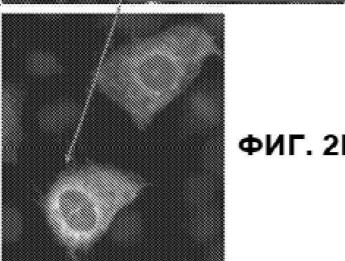
ФИГ. 2Д



ФИГ.  
2Е

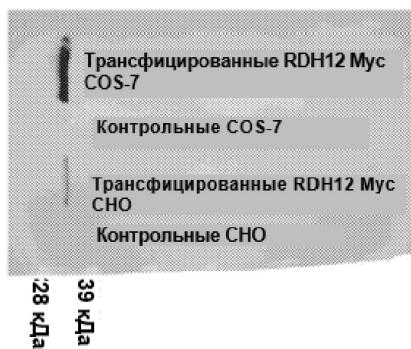


ФИГ. 2Ф



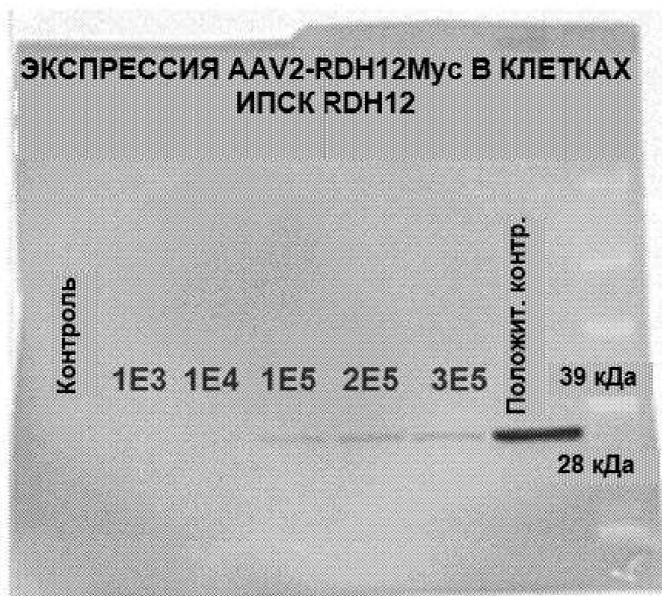
4/15

**ФИГ. 2G**



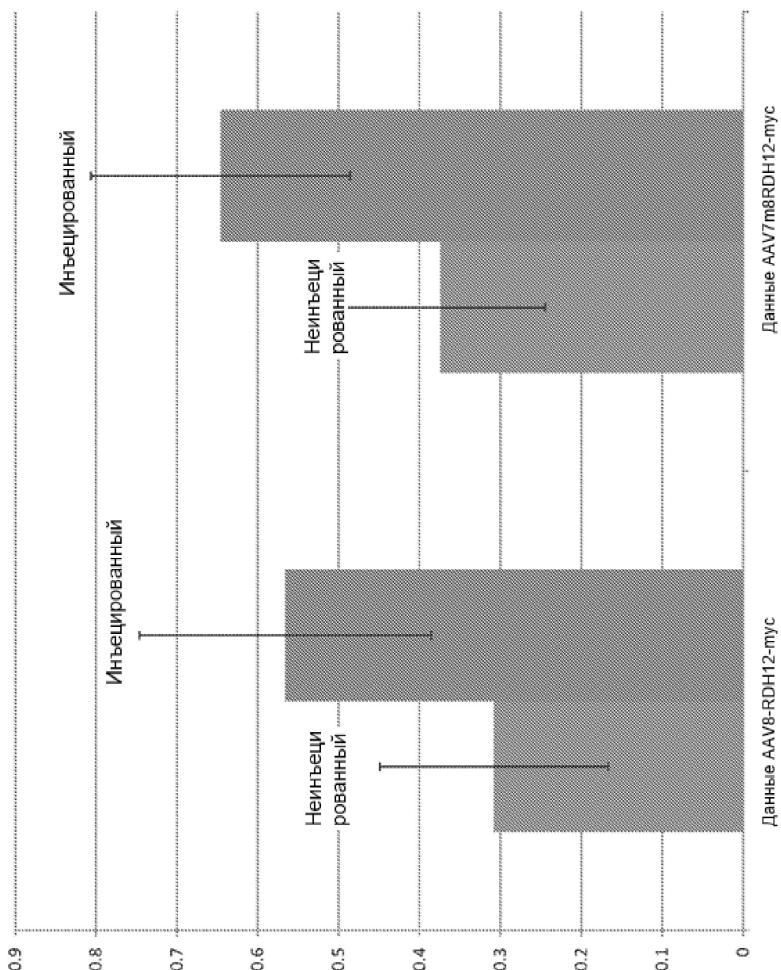
5/15

**ФИГ. 3**

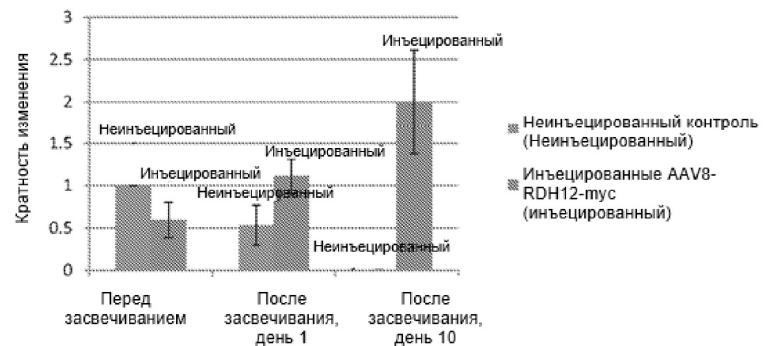
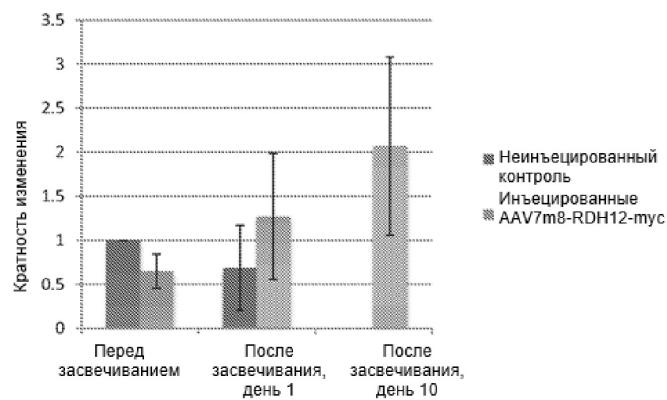


6/15

ФИГ. 4

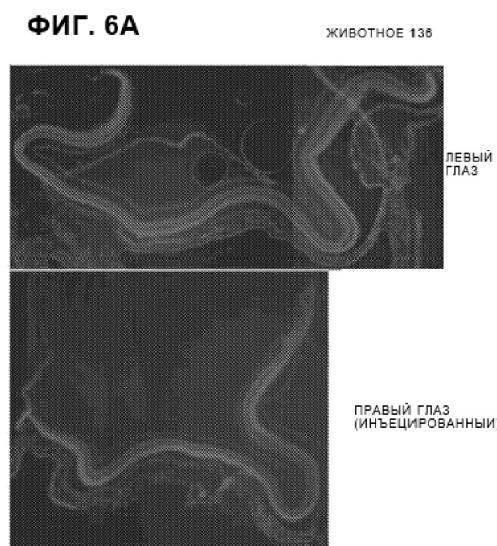


7/15

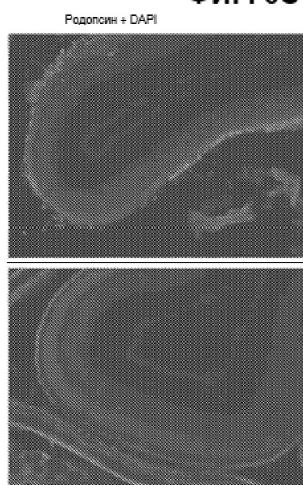
**ФИГ. 5А****ФИГ. 5В**

8/15

ФИГ. 6А



ФИГ. 6С



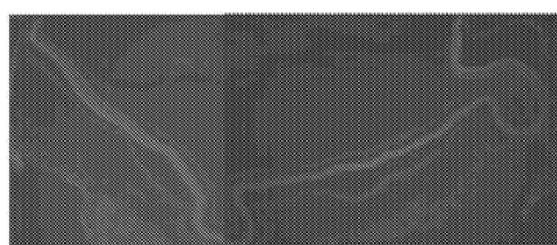
ФИГ. 6В

ФИГ. 6Д

9/15

**ФИГ. 7А**

ЛЕВЫЙ ГЛАЗ  
(НЕИНЪЕЦИРОВАННЫЙ)                    Животное 134



**ФИГ. 7В**

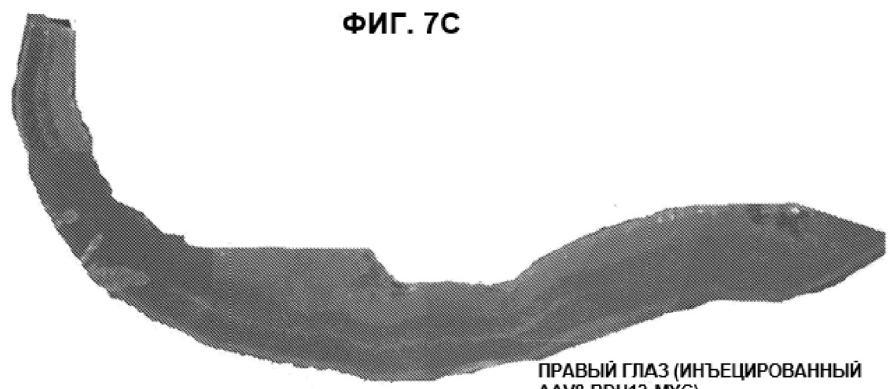
Изображение левого глаза при  
большем увеличении



Тонкий НЯС

10/15

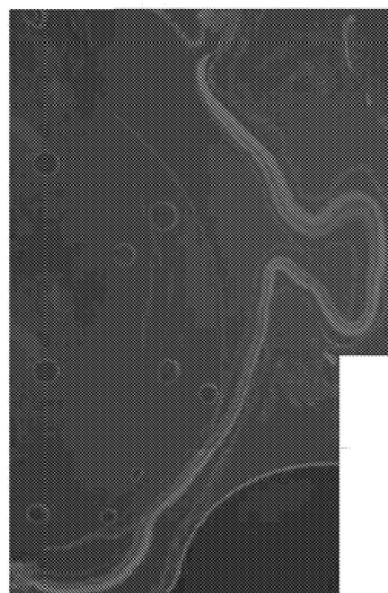
ФИГ. 7С



ПРАВЫЙ ГЛАЗ (ИНЪЕЦИРОВАННЫЙ  
AAV8-RDH12-MYC)

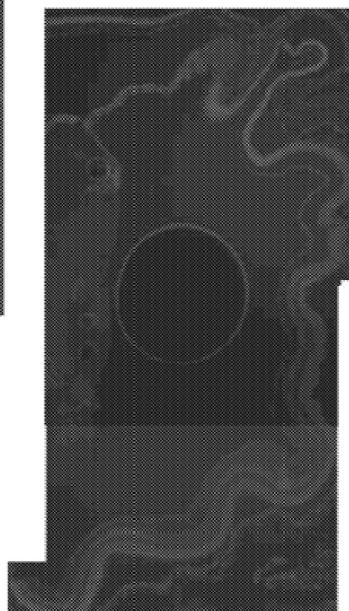
11/15

Животное 147



ЛЕВЫЙ ГЛАЗ,  
НЕИНЪЕЦИРОВАННЫЙ

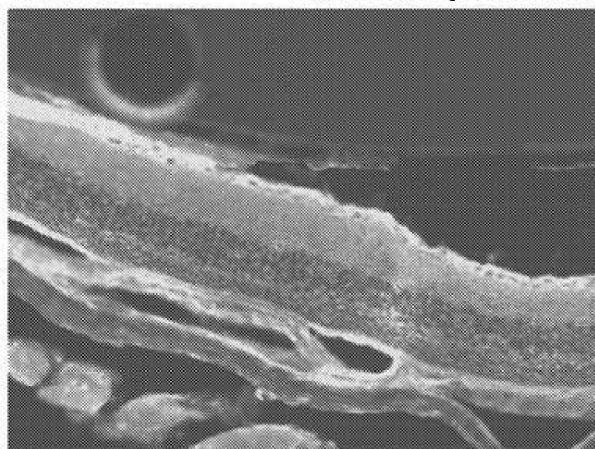
**ФИГ. 8А**



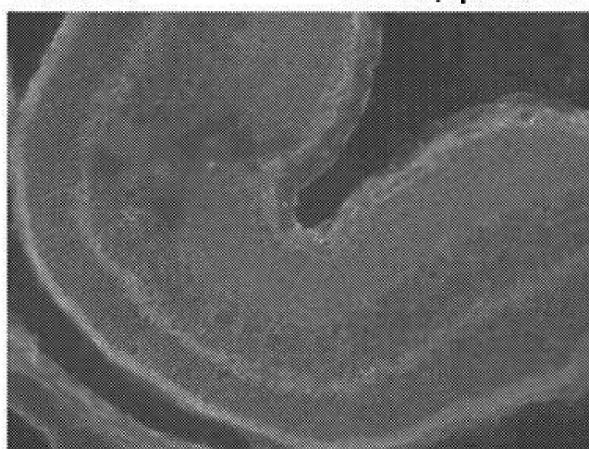
ПРАВЫЙ ГЛАЗ-ИНЪЕЦИРОВАННЫЙ  
AAV8-RDH12-Mus  
**ФИГ. 8В**

12/15

**ФИГ. 9А**                   **ЛЕВЫЙ ГЛАЗ —  
Неинъецированный**



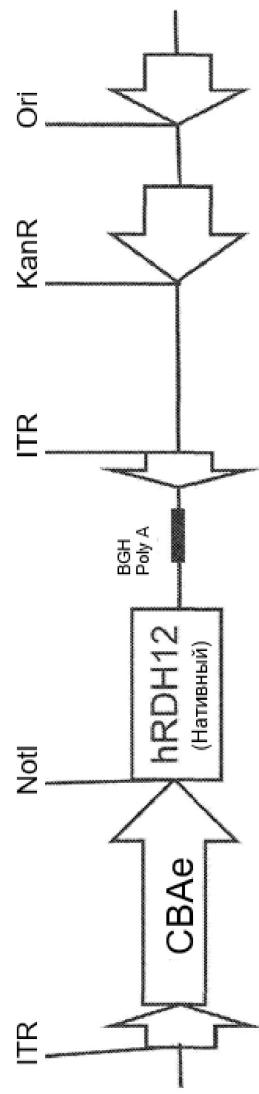
**ФИГ. 9В**                   **ПРАВЫЙ ГЛАЗ —  
Инъецированный**



13/15

ФИГ. 10А

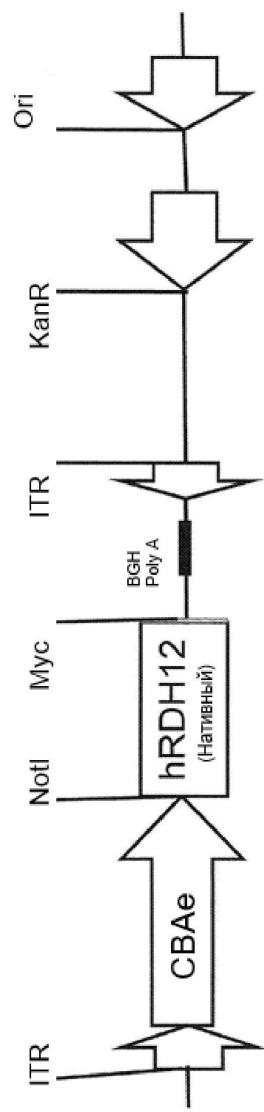
AAV.CBAe.h-Native-RDH12



14/15

ФИГ. 10В

AAV.CBAe. h-Native-RDH 12-Myc



15/15

ФИГ. 10С

AAV.CBAe.h-codon opt-RDH12

