



(51) МПК
A61K 48/00 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61K 48/00 (2021.05); C12Q 1/68 (2021.05); C12N 15/63 (2021.05); C12N 15/86 (2021.05)

(21)(22) Заявка: 2018123181, 01.12.2016

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
01.12.2016

Дата регистрации:
26.10.2021

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
03.12.2015 EP 15197901.0

(43) Дата публикации заявки: 09.01.2020 Бюл. № 1

(45) Опубликовано: 26.10.2021 Бюл. № 30

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 03.07.2018

(86) Заявка РСТ:
IV 2016/057267 (01.12.2016)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2017/093935 (08.06.2017)

Адрес для переписки:
129090, Москва, ул. Б.Спаская, 25, строение 3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры"

(72) Автор(ы):

**ХАРТЛЬ Доминик (СН),
 ШУБЕЛЕР Дирк (СН),
 РОСКА Ботонд (СН),
 КРЕБС Арnaud (СН),
 ЮТТНЕР Жозефин (СН)**

(73) Патентообладатель(и):

**ФРИДРИХ МИШЕР ИНСТИТЮТ ФОР
 БАЙОМЕДИКАЛ РИСЕРЧ (СН)**

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: WO 2013173129 A2, 21.11.2013.
БЮЛДТ Г. Изучение передачи сигналов и
веществ мембранными белками - ключевая
часть понимания работы тела. 29 ОКТ 2014
[Найдено 20.03.2020] [он-лайн]. Найдено из
Интернета: URL: <https://postnauka.ru/talks/35510>
. DATABASE, GenBank, AC164566.3, 29.11.2005,
стр.1-40 [Найдено 19.03.2020] [он-лайн].
Найдено из Интернета: (см. прод.)

(54) **SUNP161, ПРОМОТОР ДЛЯ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ В ПАЛОЧКОВЫХ
 ФОТОРЕЦЕПТОРАХ**

(57) Реферат:

Предложенная группа изобретений относится к области медицины. Предложена экспрессирующая кассета, содержащая выделенную молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую или состоящую из последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1, функционально связанную по меньшей мере с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей ген, где указанная выделенная молекула нуклеиновой кислоты является эффективной для направления

экспрессии гена в клетке палочкового фоторецептора. Предложен вектор, содержащий указанную экспрессирующую кассету. Предложен способ экспрессии гена в клетке палочкового фоторецептора и применение экспрессирующей кассеты для экспрессии гена в клетке палочкового фоторецептора. Предложенная группа изобретений обеспечивает управление экспрессией оперативно связанного гена в клетке палочкового фоторецептора через функционально связанную выделенную молекулу нуклеиновой кислоты. 4

н. и 4 з.п. ф-лы, 1 ил., 1 пр.

(56) (продолжение):

URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/82734417> . DATABASE, GenBank, FR111889.1, 11.09.2009, стр.1

[Найдено 19.03.2020] [он-лайн]. Найдено из Интернета: URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/fr111889>.

R U 2 7 5 8 2 1 1 C 2

R U 2 7 5 8 2 1 1 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
A61K 48/00 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

A61K 48/00 (2021.05); C12Q 1/68 (2021.05); C12N 15/63 (2021.05); C12N 15/86 (2021.05)(21)(22) Application: **2018123181, 01.12.2016**(24) Effective date for property rights:
01.12.2016Registration date:
26.10.2021

Priority:

(30) Convention priority:
03.12.2015 EP 15197901.0(43) Application published: **09.01.2020 Bull. № 1**(45) Date of publication: **26.10.2021 Bull. № 30**(85) Commencement of national phase: **03.07.2018**(86) PCT application:
IB 2016/057267 (01.12.2016)(87) PCT publication:
WO 2017/093935 (08.06.2017)

Mail address:

**129090, Moskva, ul. B.Spaskaya, 25, stroenie 3,
OOO "Yuridicheskaya firma Gorodisskij i
Partnery"**

(72) Inventor(s):

**HARTL, Dominik (CH),
SCHUEBELER, Dirk (CH),
ROSKA, Botond (CH),
KREBS, Arnaud (CH),
JUETTNER, Josephine (CH)**

(73) Proprietor(s):

**FRIEDRICH MIESCHER INSTITUTE FOR
BIOMEDICAL RESEARCH (CH)**(54) **SYNP161, PROMOTER FOR SPECIFIC GENE EXPRESSION IN ROD PHOTORECEPTORS**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: expressing cassette is proposed containing an isolated nucleic acid molecule containing or consisting of a nucleic acid sequence SEQ ID NO: 1 functionally connected to at least a nucleic acid sequence encoding a gene, where the specified isolated nucleic acid molecule is effective for directing the gene expression in a rod photoreceptor cell. A vector containing the specified expressing cassette is proposed.

A method for expressing a gene in a rod photoreceptor cell and use of the expressing cassette for expressing a gene in a rod photoreceptor cell are proposed.

EFFECT: proposed group of inventions provides for the control of expressing operatively bound gene in a rod photoreceptor cell through a functionally connected isolated nucleic acid molecule.

8 cl, 1 dwg, 1 ex

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к последовательности нуклеиновой кислоты, приводящей к специфической экспрессии генов в клетках палочковых фоторецепторов.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

5 В целях экспрессии рекомбинантные гены, как правило, трансфицируют в клетки-мишени, популяции клеток или ткани в виде конструкций кДНК в контексте активной экспрессирующей кассеты, чтобы сделать возможной транскрипцию гетерологичного гена. Конструкция ДНК распознается клеточным транскрипционным аппаратом в ходе
10 процесса, включающего активность многих действующих в транс-положении факторов транскрипции (TF) в цис-регуляторных элементах, включая энхансеры, сайленсеры, инсуляторы и промоторы (в настоящем описании в целом обозначаемые как "промоторы").

Промотор гена участвует на всех этих уровнях регуляции, служа детерминантой при транскрипции гена посредством интеграции влияния последовательности ДНК,
15 связывания фактора транскрипции и эпигенетических признаков. Они определяют силу, например, экспрессии трансгена, кодируемого плазмидным вектором, а также то, в каком типе или типах клеток указанный трансген будет экспрессироваться.

Наиболее распространенным промотором, используемым для регуляции экспрессии гетерологичного гена в клетках млекопитающих, является основной преддранний
20 промотор цитомегаловируса (CMV) человека и мыши. Он приводит к сильной экспрессии и оказался надежным в нескольких типах клеток. В экспрессирующих кассетах также часто используют другие вирусные промоторы, такие как преддранний промотор SV40 и промотор длинного концевой повтора (LTR) вируса саркомы Рауса (RSV).

Вместо вирусных промоторов, также можно использовать клеточные промоторы.
25 Среди известных промоторов есть промоторы генов домашнего хозяйства, кодирующие избыточно транскрибируемые клеточные транскрипты, такие как бета-актин, фактор элонгации 1-альфа (EF-1 альфа) или убиквитин. По сравнению с вирусными промоторами, экспрессия эукариотических генов является более сложной и требует точной координации множества различных факторов.

30 Одним из аспектов, касающихся применения эндогенных регуляторных элементов для экспрессии трансгена, является получение стабильной мРНК, и то, что экспрессия может происходить в природном окружении клетки-хозяина, где, таким образом, обеспечивается наличие действующих в транс-положении факторов транскрипции. Т.к. экспрессия эукариотических генов контролируется сложным аппаратом цис- и транс-
35 регуляторных элементов, большинству клеточных промоторов не хватает обширной функциональной характеристики. Части эукариотического промотора, как правило, локализуются непосредственно выше его транскрибируемой последовательности и служат в качестве точки начала транскрипции. Основной промотор непосредственно окружает участок начала транскрипции (TSS), чего достаточно для распознавания
40 аппаратом транскрипции. Проксимальный промотор содержит область выше основного промотора и содержит TSS и другие признаки последовательности, необходимые для регуляции транскрипции. Факторы транскрипции действуют специфично в отношении последовательности посредством связывания с регуляторными мотивами в промоторной и энхансерной последовательности, таким образом, активируя модифицирующие
45 хроматин и гистоны ферменты, изменяющие структуру нуклеосомы и ее положение, в конечном итоге, делая возможной инициацию транскрипции. Идентификация функционального промотора, в основном, зависит от наличия ассоциированных вышележащих или нижележащих энхансерных элементов.

Другим ключевым аспектом, касающимся применения эндогенных регуляторных элементов для экспрессии трансгена, является то, что некоторые промоторы могут действовать клеточно-специфическим образом и будут приводить к экспрессии трансгена в клетках конкретного типа или, в зависимости от промотора, в клетках конкретного

5 подтипа.

Таким образом, одной из целей настоящего изобретения является получение новых последовательностей, подходящих для экспрессии рекомбинантных генов в клетках млекопитающего с высокими уровнями экспрессии и в зависимости от типа клеток.

Такая последовательность удовлетворяет существующую в этой области потребность

10 в промоторах, специфичных для клеток сетчатки, для разработки систем для исследования нейродегенеративных нарушений, восстановления зрения, открытия лекарственных средств, противоопухолевой терапии и диагностики нарушений.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Авторы настоящего изобретения комбинировали эпигенетические,

15 биоинформатические и нейробиологические подходы для обнаружения промоторов, которые при их наличии в глазу регулируют экспрессию генов только в палочковых фоторецепторах.

Последовательностью нуклеиновой кислоты по изобретению является: ATTCGGT
CACACGGCCAAGATTATCCACCTGCGCTTTGAGCAATAGGGAGAGGGCTCTGGTG
20 CCTCTTCCTGGAATTTGATTAATTCGCTTGAGTCAGTCACAGAATTTGAGGAAGCAT
TGATATTTGAAGATGTGTTCTTCTAAAGGATACAAATGAATATATGCATAGTGAGAG
TTTAGGAGATAGG(SEQ ID NO: 1).

Таким образом, настоящее изобретение относится к выделенной молекуле нуклеиновой кислоты, содержащей или состоящей из последовательности нуклеиновой

25 кислоты SEQ ID NO: 1 или последовательности нуклеиновой кислоты по меньшей мере из 150 п.н., имеющей по меньшей мере 70% идентичности по отношению к указанной последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1, где указанная выделенная молекула нуклеиновой кислоты специфически приводит к экспрессии в палочковых фоторецепторах гена, функционально связанного с указанной последовательностью

30 нуклеиновой кислоты, кодирующей указанный ген. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты содержит по меньшей мере 150 п.н., имеет по меньшей мере 80% идентичности по отношению к указанной последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты содержит по меньшей мере

35 150 п.н. и имеет по меньшей мере 85% идентичности по отношению к указанной последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты содержит по меньшей мере 150 п.н. и имеет по меньшей мере 90% идентичности по отношению к указанной последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах

40 осуществления последовательность нуклеиновой кислоты содержит по меньшей мере 150 п.н. и имеет по меньшей мере 95% идентичности по отношению к указанной последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты содержит по меньшей мере 150 п.н. и имеет по меньшей мере 96% идентичности по отношению к указанной

45 последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты содержит по меньшей мере 150 п.н. и имеет по меньшей мере 97% идентичности по отношению к указанной последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах

осуществления последовательность нуклеиновой кислоты содержит по меньшей мере 150 п.н. и имеет по меньшей мере 98% идентичности по отношению к указанной последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты содержит по меньшей мере 150 п.н. и имеет по меньшей мере 99% идентичности по отношению к указанной последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты содержит по меньшей мере 150 п.н. и имеет 100% идентичности по отношению к указанной последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1.

Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по изобретению может дополнительно содержать минимальный промотор, например, минимальный промотор SV40, например, минимальный промотор SV40 или промотор, используемый в примерах.

Настоящее изобретение также относится к выделенной молекуле нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность, гибридизирующуюся в строгих условиях с выделенной молекулой нуклеиновой кислоты по изобретению, как описано выше.

Настоящее изобретение также относится к экспрессирующей кассете, содержащей выделенную нуклеиновую кислоту по изобретению, как описано выше, где указанный промотор функционально связан, по меньшей мере, с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей ген, для специфической экспрессии в палочковых фоторецепторах.

Настоящее изобретение дополнительно относится к вектору, содержащему экспрессирующую кассету по изобретению. В некоторых вариантах осуществления указанный вектор является вирусным вектором.

Настоящее изобретение также включает применение нуклеиновой кислоты по изобретению, экспрессирующей кассеты по изобретению или вектора по изобретению для экспрессии гена в палочковых фоторецепторах.

Настоящее изобретение дополнительно относится к способу экспрессии гена в палочковых фоторецепторах, включающему стадии трансфекции выделенной клетки, линии клеток или популяции клеток (например, ткани) с использованием экспрессирующей кассеты по изобретению, где ген, подлежащий экспрессии, будет экспрессироваться выделенной клеткой, линией клеток или популяцией клеток, если указанная клетка является палочковым фоторецептором, или указанные клетки содержат палочковые фоторецепторы. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка, линия клеток, или популяция клеток, или ткань является человеческой.

Настоящее изобретение также относится к выделенной клетке, содержащей экспрессирующую кассету по изобретению. В некоторых вариантах осуществления экспрессирующая кассета или вектор стабильно встроены в геном указанной клетки.

Типичный ген, который может быть функционально связан с промотором по изобретению, является геном, кодирующим галородопсин или канальный родопсин.

Кроме того, настоящее изобретение также относится к набору для экспрессии гена в палочковых фоторецепторах, содержащему выделенную молекулу нуклеиновой кислоты по изобретению.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Фигура 1: Изображения экспрессии EGFP, полученные с помощью лазерной сканирующей конфокальной микроскопии, при использовании промотора SEQ ID NO: 1, через 3 недели после субретинальной инъекции AAV-synP161-ChR2-EGFP в глаза взрослой мыши C57BL/6 в виде боковой проекции и вида сверху в слое фоторецепторов. Можно наблюдать индуцированную экспрессию в клетках палочковых фоторецепторов. Зеленый=EGFP, регулируемый SEQ ID NO: 1, красный=mCAR, белый=hexst.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Авторы настоящего изобретения комбинировали эпигенетические, биоинформатические и нейробиологические подходы для обнаружения промоторов, которые при их наличии в глазу регулируют экспрессию генов только в палочковых фоторецепторах.

Последовательностью нуклеиновой кислоты по изобретению является: ATTCGGT CACACGGCCAAGATTATTCCACCTGCGCTTTGAGCAATAGGGAGAGGGCTCTGGTG CCTCTTCCTGGAATTTGATTAATTCGCTTGAGTCAGTCACAGAATTTGAGGAAGCAT TGATATTTGAAGATGTGTTCTTCTAAAGGATACAAATGAATATATGCATAGTGAGAG TTTAGGAGATAGG (SEQ ID NO: 1).

Таким образом, настоящее изобретение относится к выделенной молекуле нуклеиновой кислоты, содержащей или состоящей из последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1 или последовательности нуклеиновой кислоты из по меньшей мере 150 п.н., имеющей по меньшей мере 70% идентичности по отношению к указанной последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1, где указанная выделенная молекула нуклеиновой кислоты специфически приводит к экспрессии в палочковых фоторецепторах гена, функционально связанного с указанной последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей указанный ген. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты содержит по меньшей мере 150 п.н., имеет по меньшей мере 80% идентичности по отношению к указанной последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты содержит по меньшей мере 150 п.н. и имеет по меньшей мере 85% идентичности по отношению к указанной последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты содержит по меньшей мере 150 п.н. и имеет по меньшей мере 90% идентичности по отношению к указанной последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты содержит по меньшей мере 150 п.н. и имеет по меньшей мере 95% идентичности по отношению к указанной последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты содержит по меньшей мере 150 п.н. и имеет по меньшей мере 96% идентичности по отношению к указанной последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты содержит по меньшей мере 150 п.н. и имеет по меньшей мере 97% идентичности по отношению к указанной последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты содержит по меньшей мере 150 п.н. и имеет по меньшей мере 98% идентичности по отношению к указанной последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты содержит по меньшей мере 150 п.н. и имеет по меньшей мере 99% идентичности по отношению к указанной последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты содержит по меньшей мере 150 п.н. и имеет 100% идентичности по отношению к указанной последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1.

Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по изобретению может дополнительно содержать минимальный промотор, например, минимальный промотор SV40, например, минимальный промотор SV40 или промотор, используемый в примерах.

Настоящее изобретение также относится к выделенной молекуле нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность, гибридизующуюся в строгих условиях с выделенной молекулой нуклеиновой кислоты по изобретению, как описано выше.

5 Настоящее изобретение также относится к экспрессирующей кассете, содержащей выделенную нуклеиновую кислоту по изобретению, как описано выше, где указанный промотор функционально связан, по меньшей мере, с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей ген для специфической экспрессии в палочковых фоторецепторах.

Настоящее изобретение дополнительно относится к вектору, содержащему экспрессирующую кассету по изобретению. В некоторых вариантах осуществления 10 указанный вектор является вирусным вектором.

Настоящее изобретение также включает применение нуклеиновой кислоты по изобретению, экспрессирующей кассеты по изобретению или вектора по изобретению для экспрессии гена в палочковых фоторецепторах.

Настоящее изобретение дополнительно относится к способу экспрессии гена в 15 палочковых фоторецепторах, включающему стадии трансфекции выделенной клетки, линии клеток или популяции клеток (например, ткани) с использованием экспрессирующей кассеты по изобретению, где ген, подлежащий экспрессии, будет экспрессироваться выделенной клеткой, линией клеток или популяцией клеток, если указанная клетка является палочковым фоторецептором, или указанные клетки содержат 20 палочковые фоторецепторы. В некоторых вариантах осуществления выделенная клетка, линия клеток, популяция клеток или ткань является человеческой.

Настоящее изобретение также относится к выделенной клетке, содержащей экспрессирующую кассету по изобретению. В некоторых вариантах осуществления экспрессирующая кассета или вектор стабильно встроены в геном указанной клетки.

25 Типичный ген, который может быть функционально связан с промотором по изобретению, является геном, кодирующим галородопсин или канальный родопсин.

Кроме того, настоящее изобретение также относится к набору для экспрессии гена в палочковых фоторецепторах, содержащему выделенную молекулу нуклеиновой кислоты по изобретению.

30 В рамках изобретения, термин "промотор" относится к любым цис-регуляторным элементам, включая энхансеры, сайленсеры, инсуляторы и промоторы. Промотор является областью ДНК, как правило, локализуемой выше (в сторону 5'-области) гена, подлежащего транскрипции. Промотор делает возможной правильную активацию или репрессию гена, который он контролирует. В контексте по настоящему изобретению 35 промоторы приводят к специфической экспрессии генов, функционально связанных с ними, в палочковых фоторецепторах. Термин "специфическая экспрессия", также означающий "экспрессию только в конкретном типе клеток", означает, что более по меньшей мере 75% клеток, экспрессирующих интересующий ген, имеют определенный тип, т.е. в данном случае являются палочковыми фоторецепторами.

40 Экспрессирующие кассеты, как правило, встраивают в вектор, облегчающий проникновение экспрессирующей кассеты в клетку-хозяина и сохранение экспрессирующей кассеты в клетке-хозяине. Такие векторы являются общеупотребительными и хорошо известны специалистам в этой области. Множество таких векторов коммерчески доступно, например, в Invitrogen, Stratagene, Clontech и т.д., 45 и описаны во множестве руководств, таких как Ausubel, Guthrie, Strathem или Berger, указанные выше. Такие векторы, как правило, включают промоторы, сигналы полиаденилирования и т.д. в комбинации с участками множественного клонирования, а также дополнительные элементы, такие как участки начала репликации, гены

селективных маркеров (например, LEU2, URA3, TRP 1, HIS3, GFP), центромерные последовательности и т.д.

Вирусные векторы, например, AAV, PRV или лентивирус, подходят для направленного воздействия и доставки генов в палочковые фоторецепторы с использованием промотора по изобретению.

Выходной сигнал клеток сетчатки можно измерять электрическим способом, таким как с помощью мультиэлектродной матрицы или локальной фиксации потенциала, или визуальным способом, таким как определение флуоресценции.

Способы с использованием последовательности нуклеиновой кислоты по изобретению можно использовать для идентификации терапевтических средств для лечения неврологического нарушения или нарушения сетчатки, затрагивающего палочковые фоторецепторы, указанный способ включает стадии приведения тестируемого соединения в контакт с палочковыми фоторецепторами, экспрессирующими один или несколько трансгенов под контролем промотора по изобретению, и сравнение по меньшей мере одного выходного сигнала палочковых фоторецепторов, полученного в присутствии указанного тестируемого соединения, с тем же выходным сигналом, полученным в отсутствие указанного тестируемого соединения.

Кроме того, способы с использованием промоторов по изобретению также можно использовать для тестирования восстановления зрения *in vitro*, указанный способ включает стадии приведения палочковых фоторецепторов, экспрессирующих один или несколько трансгенов под контролем промотора по изобретению, в контакт со средством и сравнение по меньшей мере одного выходного сигнала, полученного после контакта с указанным средством, с тем же выходным сигналом, полученным до указанного контакта с указанным средством.

Канальные родопсины являются подсемейством опсиновых белков, функционирующих как светочувствительные ионные каналы. Они служат в качестве сенсорных фоторецепторов в одноклеточных зеленых водорослях, контролирующих фототаксис, т.е. движение в ответ на свет. Экспрессируясь в клетках других организмов, они позволяют использовать свет для контроля внутриклеточной кислотности, притока кальция, электрической возбудимости и других клеточных процессов. В настоящее время известно по меньшей мере три "природных" канальных родопсина: канальный родопсин-1 (ChR1), канальный родопсин-2 (ChR2) и канальный родопсин вольвокса (VChR1). Кроме того, также существуют некоторые модифицированные/улучшенные версии этих белков. Все известные канальные родопсины являются неспецифическими катионными каналами, пропускающими ионы H^+ , Na^+ , K^+ и Ca^{2+} .

Галородопсин является светочувствительным ионным насосом, специфичным для хлорид-ионов и обнаруживаемым в филогенетически древних "бактериях" (археях), известных как галобактерии. Он является белком с семью трансмембранными доменами из семейства ретинилиденовых белков, гомологичным светочувствительному протонному насосу бактериородопсину и схожим третичной структурой (но не структурой первичной последовательности) с родопсинами позвоночных, пигментами, воспринимающими свет в сетчатке. Галородопсин также обладает сходством последовательности с канальным родопсином, светочувствительным ионным каналом. Галородопсин содержит важное изомеризующееся под действием света производное витамина А полностью-транс-ретинол. Галородопсин является одним из нескольких мембранных белков, кристаллическая структура которых известна. Изоформы галородопсина можно найти у множества видов галобактерий, включая *H. salinarum* и *N. pharaonis*. Во многих текущих исследованиях изучают эти различия и используют их

для анализа фотоцикла и свойств насоса. После бактериородопсина, галородопсин может являться лучшим исследуемым опсином типа I (микробным). Пик поглощения комплекса галородопсина и ретиналя составляет приблизительно 570 нм. В последнее время галородопсин становится инструментом оптогенетики. Когда активируемый синим светом ионный канал канальный родопсин-2 открывает возможность активации возбудимых клеток (таких как нейроны, мышечные клетки, клетки поджелудочной железы и иммунные клетки) короткими импульсами синего света, галородопсин открывает возможность сайленсинга возбудимых клеток короткими импульсами желтого света. Таким образом, галородопсин и канальный родопсин вместе делают возможной многоцветную оптическую активацию, сайленсинг и десинхронизацию активности нейронов, что приводит к созданию мощного инструмента для нейроинженерии.

В некоторых вариантах осуществления промотор является частью вектора, направленного на сетчатку, экспрессирующего по меньшей мере один репортерный ген, детектируемый в живых палочковых фоторецепторах.

Подходящие вирусные векторы для изобретения хорошо известны в этой области. Например, AAV, PRV или лентивирус подходят для направленного воздействия и доставки генов в палочковые фоторецепторы.

При работе с выделенной сетчаткой оптимальной вирусной доставки в клетки сетчатки можно достигать посредством заливки ганглиоцитами вниз, таким образом, что фоторецепторная сторона сетчатки экспонирована и, таким образом, ее легче трансфицировать. Другим способом является получение срезов, например, с использованием лезвия бритвы, внутренней ограничивающей мембраны сетчатки таким образом, что вирусы для доставки могут проникать через внутренние мембраны. Дополнительным способом является заливка сетчатки в агар, получение срезов указанной сетчатки и нанесение вирусов для доставки со стороны среза.

Выходной сигнал трансфицированных клеток можно измерять хорошо известными способами, например, электрическим способом, таким как с помощью мультиэлектродной матрицы или локальной фиксации потенциала, или визуальным способом, таким как определение флуоресценции. В некоторых случаях внутреннюю ограничивающую мембрану удаляют посредством микрохирургической операции на внутренней ограничивающей мембране. В других случаях регистрацию осуществляют с помощью срезов внутренней ограничивающей мембраны.

Для настоящего изобретения можно использовать любой источник клеток сетчатки. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки сетчатки получают из сетчатки человека, или они находятся в ней. В других вариантах осуществления сетчатку получают из животного, например, из крупного рогатого скота или грызуна. Сетчатку человека легко можно получать из банков роговиц, в которых указанные сетчатки, как правило, выбрасывают после иссечения роговицы. Сетчатка взрослого человека имеет большую поверхность (приблизительно 1100 мм²), и, таким образом, ее легко можно разделять на ряд экспериментальных подобластей. Кроме того, сетчатки также можно использовать в качестве изящной модели синаптической коммуникации, т.к. сетчатка имеет синапсы, идентичные остальной части головного мозга.

В рамках изобретения, термин "животное" используют в настоящем описании так, что он включает всех животных. В некоторых вариантах осуществления изобретения не относящиеся к человеку животные являются позвоночными. Примерами животных являются человек, мыши, крысы, коровы, свиньи, лошади, курицы, утки, гуси, кошки, собаки и т.д. Термин "животное" также включает отдельное животное на всех стадиях

развития, включая стадии эмбриона и плода. "Генетически модифицированное животное" является любым животным, содержащим одну или несколько клеток, несущих генетическую информацию, изменяемую или получаемую, прямо или косвенно, посредством преднамеренной генетической манипуляции на субклеточном уровне, такой как направленная рекомбинация, микроинъекция или инфицирование рекомбинантным вирусом. Термин "генетически модифицированное животное" не предназначен для включения классического кроссбридинга или оплодотворения *in vitro*, а предназначен для включения животных, у которых одну или несколько клеток изменяют посредством рекомбинантной молекулы ДНК или вводят ее в эти клетки. Эта рекомбинантная молекула ДНК может быть специфически направлена к определенному генетическому локусу, может случайным образом встраиваться в хромосому или может являться экстрахромосомно реплицирующейся ДНК. Термин "генетически модифицированное животное зародышевой линии" относится к генетически модифицированному животному, в котором генетическое изменение или генетическую информацию вносят в клетки зародышевой линии, таким образом, придавая способность передавать генетическую информацию своему потомству. Если такое потомство фактически обладает некоторыми или всеми такими изменениями или генетической информацией, они также являются генетически модифицированными животными.

Изменение или генетическая информация могут быть чужеродными виду животного, к которому принадлежит реципиент, или чужеродными только для конкретного реципиента, или может являться генетической информацией, уже имеющейся у реципиента. В последнем случае измененный или встроенный ген может экспрессироваться иначе, чем нативный ген, или не экспрессироваться вовсе.

Гены, используемые для изменения гена-мишени, можно получать с помощью широкого спектра способов, включающих, в качестве неограничивающих примеров, выделение из геномных источников, получение кДНК из выделенных матриц мРНК, прямой синтез или их комбинацию.

Типом клеток-мишеней для встраивания трансгена являются клетки ES. Клетки ES можно получать из эмбрионов до имплантации, культивировать *in vitro* и подвергать слиянию с эмбрионами (Evans et al. (1981), Nature 292:154-156; Bradley et al. (1984), Nature 309:255-258; Gossler et al. (1986), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:9065-9069; Robertson et al. (1986), Nature 322:445-448; Wood et al. (1993), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:4582-4584). Трансгены можно эффективно встраивать в клетки ES стандартными способами, такими как трансфекция ДНК с использованием электропорации или опосредованной ретровирусом трансдукции. Затем полученные трансформированные клетки ES можно комбинировать с морулами посредством агрегации или инъектировать в бластоцисты из не являющегося человеком животного. Затем встраиваемые клетки ES колонизируют эмбрион и вносят вклад в зародышевую линию получаемого химерного животного (Jaenisch (1988), Science 240:1468-1474). Использование генетически направленных клеток ES в получении генетически направленных, генетически модифицированных мышей описано в 1987 году (Thomas et al. (1987), Cell 51:503-512), а также в других источниках (Frohman et al. (1989), Cell 56:145-147; Capecchi (1989), Trends in Genet. 5:70-76; Baribault et al. (1989), Mol. Biol. Med. 6:481-492; Wagner (1990), EMBO J. 9:3025-3032; Bradley et al. (1992), Bio/Technology 10:534-539).

Доступны способы инактивации или изменения любой генетической области с помощью любой желаемой мутации с использованием направленной гомологичной рекомбинации для внесения конкретных изменений в хромосомные аллели.

В рамках изобретения, термин "направленный ген" означает последовательность

ДНК, встраиваемую в зародышевую линию не являющегося человеком животного посредством вмешательства человека, включая, в качестве неограничивающих примеров, способы, представленные в настоящем описании. Направленные гены по изобретению включают последовательности ДНК, сконструированные для конкретного изменения когнатных эндогенных аллелей.

В настоящем изобретении, термин "выделенный" относится к материалу, удаленному из своего исходного окружения (например, природного окружения, если он является природным) и, таким образом, измененному "рукой человека" относительно своего природного состояния. Например, выделенный полинуклеотид может являться частью вектора или композиции веществ или содержаться в клетке и все равно являться "выделенным", т.к. этот вектор, композиция веществ или конкретная клетка не являются исходным окружением полинуклеотида. Термин "выделенный" не относится к геномным библиотекам или библиотекам кДНК, препаратам целых клеток или препаратам мРНК, препаратам геномной ДНК (включая препараты, разделенные посредством электрофореза и перенесенные на блоты), препаратам фрагментированной геномной ДНК целых клеток или другим композициям, где на предшествующем уровне техники не наблюдают отличительных признаков полинуклеотида/последовательностей по настоящему изобретению. Дополнительные примеры выделенных молекул ДНК включают рекомбинантные молекулы ДНК, поддерживаемые в гетерологичных клетках-хозяевах, или очищенные (частично или по существу) молекулы ДНК в растворе. Выделенные молекулы РНК включают транскрипты РНК *in vivo* или *in vitro* из молекул ДНК по настоящему изобретению. Однако, нуклеиновая кислота, содержащаяся в клоне, являющемся составляющей библиотеки (например, геномной библиотеки или библиотеки кДНК), не отделенным от других составляющей библиотеки (например, в форме однородного раствора, содержащего клон и другие составляющие библиотеки), или хромосома, удаленная из клетки или лизата клеток (например, "хромосомный препарат", как в кариотипе), или препарат случайным образом фрагментированной геномной ДНК или препарат геномной ДНК, обработанной с использованием одного или нескольких ферментов рестрикции, не являются "выделенными" в соответствии с целями настоящего изобретения. Как представлено в настоящем описании, выделенные молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению можно получать естественным образом, рекомбинантно или синтетически.

"Полинуклеотиды" могут состоять из одно- и двухцепочечной ДНК, ДНК, являющейся смесью одно- и двухцепочечных областей, одно- и двухцепочечной РНК и РНК, являющейся смесью одно- и двухцепочечных областей, гибридными молекулами, содержащими ДНК и РНК, которые могут быть одноцепочечными или, что более типично, двухцепочечными или смесью одно- и двухцепочечных областей. Кроме того, полинуклеотиды могут состоять из трехцепочечных областей, содержащих РНК или ДНК или и РНК, и ДНК. Полинуклеотиды также могут содержать одно или несколько модифицированных оснований или остовов ДНК или РНК, модифицированных для стабильности или по другим причинам. "Модифицированные" основания включают, например, тритилированные основания и нетипичные основания, такие как инозин. Можно осуществлять множество модификаций ДНК и РНК; таким образом, "полинуклеотид" включает химически, ферментативно или метаболически модифицированные формы.

Выражение "полинуклеотид, кодирующий полипептид" включает полинуклеотид, включающий только кодирующую последовательность для полипептида, а также полинуклеотид, включающий дополнительную кодирующую и/или некодирующую

последовательность.

Термин "строгие условия гибридизации" относится к инкубации в течение ночи при 42°C в растворе, содержащем 50% формамида, 5-кратный SSC (750 мМ NaCl, 75 мМ трицитрата натрия), 50 мМ фосфата натрия (рН 7,6), 5-кратный раствор Денхардта, 10% сульфата декстрана и 20 мкг/мл денатурированной, фрагментированной ДНК 5
молока лососевых, последующей промывки фильтров в 0,1-кратном SSC при приблизительно 50°C. Изменения строгости гибридизации и детекции сигнала осуществляют, главным образом, посредством манипуляций с концентрацией формамида (более низкая процентная доля формамида приводит к сниженной строгости); солями 10
или температурой. Например, условия с умеренно высокой строгостью включают инкубацию в течение ночи при 37°C в растворе, содержащем 6-кратный SSPE (20-кратный SSPE=3 М NaCl; 0,2 М NaH₂PO₄; 0,02 М ЭДТА, рН 7,4), 0,5% SDS, 30% формамида, 100 мкг/мл блокирующей ДНК молока лососевых; с последующими 15
промывками при 50°C 1-кратным SSPE, 0,1% SDS. Кроме того, для достижения даже более низкой строгости промывки, осуществляемые после гибридизации в строгих условиях можно осуществлять при более высоких концентрациях соли (например, в 5-кратном SSC). Изменения указанных выше условий можно осуществлять посредством 20
включения и/или замены альтернативных блокирующих реагентов, используемых для подавления фона в экспериментах по гибридизации. Типичные блокирующие реагенты включают раствор Денхардта, BLOTTO, гепарин, денатурированную ДНК молока лососевых и коммерчески доступные патентованные составы. Включение конкретных блокирующих реагентов может потребовать модификации условий гибридизации, описанных выше, по причине проблем с совместимостью.

Термины "фрагмент", "производное" и "аналог" в отношении полипептидов означают 25
полипептиды, сохраняющие, по существу, ту же биологическую функцию или активность, что и такие полипептиды. Аналог включает пробелок, который можно активировать посредством расщепления пробелковой части с образованием активного зрелого полипептида.

Термин "ген" означает сегмент ДНК, участвующий в образовании полипептидной 30
цепи; он включает области, предшествующие и следующие за кодирующей областью, "лидерную и трейлерную последовательность", а также промежуточные последовательности (интроны) между отдельными кодирующими сегментами (экзонами).

Полипептиды могут состоять из аминокислот, соединенных друг с другом 35
пептидными связями или модифицированными пептидными связями, т.е. являться пептидными изостерами, и могут содержать аминокислоты, иные, чем 20 кодируемых генетическим кодом аминокислот. Полипептиды можно модифицировать с помощью природных процессов, таких как посттрансляционный процессинг, или способами химической модификации, хорошо известными в этой области. Такие модификации 40
хорошо описаны в руководствах и более подробных монографиях, а также в обширной исследовательской литературе. Модификации могут возникать в любом месте полипептида, включая пептидный остов, боковые группы аминокислот и amino- или карбокси-конец. Следует понимать, что один и тот же тип модификации может присутствовать в одинаковой или разных степенях в нескольких участках указанного полипептида. Кроме того, указанный полипептид может содержать множество типов 45
модификаций. Полипептиды могут быть разветвленными, например, в результате убиквитинилирования, и циклическими с разветвлением или без него. Циклические, разветвленные и разветвленные циклические полипептиды могут являться результатом природных посттрансляционных процессов, или их можно получать способами синтеза.

Модификации включают, в качестве неограничивающих примеров, ацетилирование, ацилирование, биотинилирование, АДФ-рибозилирование, амидирование, ковалентное присоединение флавина, ковалентное присоединение остатка гема, ковалентное присоединение нуклеотида или производного нуклеотида, ковалентное присоединение липида или производного липида, ковалентное присоединение фосфотидилинозитола, перекрестное сшивание, циклизацию, дериватизацию с помощью известных защитных/блокирующих групп, образование дисульфидной связи, деметилирование, образование ковалентных перекрестных связей, образование цистеина, образование пироглутамата, формилирование, гамма-карбоксилирование, гликозилирование, образование GPI-якоря, гидрокселирование, йодирование, соединение с молекулой антитела или другим клеточным лигандом, метилирование, миристоилирование, окисление, пегилирование, протеолитический процессинг (например, расщепление), фосфорилирование, пренилирование, рацемизацию, селеноилирование, сульфатирование, опосредованное транспортной РНК добавление аминокислот в белки, такое как аргинилирование, и убиквитинилирование (См., например, PROTEINS-STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES, 2nd Ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman и Company, New York (1993); POSTTRANSLATIONAL COVALENT MODIFICATION OF PROTEINS, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, pgs. I-12 (1983); Seifter et al., Meth Enzymol 182:626-646 (1990); Rattan et al., Ann NY Acad Sci 663:48-62 (1992)).

Термин "полипептидный фрагмент, "имеющий биологическую активность"" относится к полипептидам, проявляющим активность, схожую, но не обязательно идентичную, с активностью исходного полипептида, включая зрелые формы, что измеряют с помощью конкретного биологического анализа, с зависимостью от дозы или без нее. В случае наличия зависимости от дозы, она может не являться идентичной таковой у полипептида, но чаще, по существу, схожа с зависимостью от дозы в случае указанной активности исходного полипептида (т.е. полипептид-кандидат будет проявлять более высокую активность или не более чем в приблизительно 25 раз меньшую, и в некоторых вариантах осуществления не более чем в приблизительно десять раз меньшую активность, или не более чем в приблизительно три раза меньшую активность относительно исходного полипептида).

Можно выделять и идентифицировать гомологи других видов, получая подходящие зонды или праймеры из последовательностей, представленных в настоящем описании, и осуществляя скрининг подходящего источника нуклеиновых кислот для желаемого гомолога.

Термин "вариант" относится к полинуклеотиду или полипептиду, отличающемуся от исходного полинуклеотида или полипептида, но сохраняющему его важные свойства. Как правило, варианты, в целом, сильно схожи и, во многих областях, идентичны исходному полинуклеотиду или полипептиду.

С практической точки зрения, то, идентична ли любая конкретная молекула нуклеиновой кислоты или полипептида по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% нуклеотидной последовательности по настоящему изобретению, можно определять общепринятым образом с использованием известных компьютерных программ. Предпочтительный способ определения лучшего общего совпадения между последовательностью запроса (последовательностью по настоящему изобретению) и исследуемой последовательностью, также обозначаемый как глобальное выравнивание последовательности, можно осуществлять с использованием компьютерной программы FASTDB на основе алгоритма Brutlag et al. (Comp. App. Biosci. (1990) 6:237-245). При выравнивании последовательностей последовательность запроса

и исследуемая последовательность являются последовательностями ДНК.

Последовательность РНК можно сравнивать, преобразуя U в T. Результат указанного глобального выравнивания последовательностей указывают в процентах идентичности.

Предпочтительными параметрами, используемыми при выравнивании FASTDB

5 последовательностей ДНК для вычисления процента идентичности, являются: матрица=унитарная, размер участка максимального совпадения=4, штраф за несовпадение - 1, штраф за соединение - 30, длина группы рандомизации=0, граничное значение=1, штраф за пропуск - 5, штраф за размер пропуска - 0,05, размер окна=500 или длина исследуемой нуклеотидной последовательности, в зависимости от того, какая последовательность

10 короче. Если исследуемая последовательность короче последовательности запроса из-за 5'- или 3'-делеций, а не из-за внутренней делеции, необходимо осуществлять корректировку результатов вручную. Причиной этого является то, что в программе FASTDB не учитываются укорачивания 5'- и 3'-концов исследуемой последовательности при вычислении процента идентичности. В случае исследуемых последовательностей

15 с укороченными 5'- или 3'-концами относительно последовательности запроса процент идентичности корректируют посредством вычисления количества оснований последовательности запроса, представляющих собой 5'- и 3'-концы исследуемой последовательности, являющихся несовпадающими/невыровненными, как процент

20 общего количества оснований последовательности запроса. То, является ли нуклеотид совпадающим/выровненным, определяют по результатам выравнивания последовательностей FASTDB. Затем этот процент вычитают из процента идентичности, вычисленного с помощью указанной выше программы FASTDB с использованием определенных параметров, для получения конечного значения процента идентичности. Это скорректированное значение используют в целях по настоящему изобретению.

25 Только основания вне оснований 5'- и 3'-концов исследуемой последовательности, определяемые при выравнивании FASTDB, являющиеся несовпадающими/невыровненными с последовательностью запроса, вычисляют с целью ручной коррекции значения процента идентичности. Например, исследуемую последовательность из 90 оснований выравнивают с последовательностью запроса из 100 оснований для

30 определения процента идентичности. Делеции находятся на 5'-конце исследуемой последовательности, и, таким образом, при выравнивании FASTDB не наблюдают совпадение/выравнивание первых 10 оснований на 5'-конце. 10 неспаренных оснований представляют собой 10% последовательности (количество несовпадающих оснований на 5'- и 3'-концах/общее количество оснований в последовательности запроса), таким

35 образом, 10% вычитают из значения процента идентичности, вычисленного с помощью программы FASTDB. Если оставшиеся 90 оснований полностью совпадают, конечный процент идентичности будет составлять 90%. В другом примере, исследуемую последовательность из 90 оснований сравнивают с последовательностью запроса из 100 оснований. В этом случае делеции являются внутренними делециями таким образом,

40 что нет оснований на 5'- или 3'-конце исследуемой последовательности, несовпадающих/невыровненных с последовательностью запроса. В этом случае процент идентичности, вычисленный с помощью FASTDB, не корректируют вручную. И снова, только основания на 5'- и 3'-конце исследуемой последовательности, несовпадающие/невыровненные с последовательностью запроса, корректируют вручную.

45 Что касается полипептида, имеющего аминокислотную последовательность, по меньшей мере, например, на 95% "идентичную" аминокислотной последовательности запроса по настоящему изобретению, следует понимать, что аминокислотная последовательность исследуемого полипептида идентична последовательности запроса,

за исключением того, что исследуемая полипептидная последовательность может включать до пяти изменений аминокислот на каждые 100 аминокислот аминокислотной последовательности запроса. Другими словами, для получения полипептида, имеющего аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную аминокислотной последовательности запроса, до 5% аминокислотных остатков в исследуемой последовательности могут подвергаться inserции, делеции или замене другой аминокислотой. Эти изменения референсной последовательности могут находиться в амино- или карбокси-концевых положениях референсной аминокислотной последовательности или где-либо между этими концевыми положениями, рассеянные среди остатков в референсной последовательности по отдельности или в одной или нескольких смежных группах.

С практической точки зрения, то, идентичен ли какой-либо конкретный полипептид по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%, например, аминокислотным последовательностям, представленным в последовательности, или аминокислотной последовательности, кодируемой депонируемым клоном ДНК, можно определять общепринятым образом с использованием известных компьютерных программ. Предпочтительный способ определения лучшего общего совпадения между последовательностью запроса (последовательностью по настоящему изобретению) и исследуемой последовательностью, также обозначаемый как глобальное выравнивание последовательности, можно осуществлять с использованием компьютерной программы FASTDB на основе алгоритма Brutlag et al. (Comp. App. Biosci. (1990) 6:237-245). При выравнивании последовательностей последовательность запроса и исследуемая последовательность являются нуклеотидными последовательностями или аминокислотными последовательностями. Результат указанного глобального выравнивания последовательностей указывают в процентах идентичности. Предпочтительными параметрами, используемыми при выравнивании FASTDB аминокислотных последовательностей, являются: матрица=РАМ 0, размер участка максимального совпадения=2, штраф за несовпадение - 1, штраф за соединение=20, длина группы рандомизации=0, граничное значение=1, размер окна=длина последовательности, штраф за пропуск - 5, штраф за размер пропуска - 0,05, размер окна=500 или длина исследуемой аминокислотной последовательности, в зависимости от того, какая последовательность короче. Если исследуемая последовательность короче последовательности запроса из-за N- или C-концевых делеций, а не из-за внутренней делеции, необходимо осуществлять корректировку результатов вручную. Причиной этого является то, что в программе FASTDB не учитываются укорачивания N- и C-концов исследуемой последовательности при вычислении глобального процента идентичности. В случае исследуемых последовательностей с укороченными N- и C-концами относительно последовательности запроса процент идентичности корректируют посредством вычисления количества остатков последовательности запроса, представляющих собой N- и C-концы исследуемой последовательности, несовпадающие/ невыровненные с соответствующим исследуемым остатком, как процент общего количества оснований последовательности запроса. То, является ли нуклеотид совпадающим/выровненным, определяют по результатам выравнивания последовательностей FASTDB. Затем этот процент вычитают из процента идентичности, вычисленного с помощью указанной выше программы FASTDB с использованием определенных параметров, для получения конечного значения процента идентичности. Это скорректированное значение используют в целях по настоящему изобретению. Только остатки на N- и C-концах исследуемой последовательности, несовпадающие/

5 невыровненные с последовательностью запроса, учитывают в целях ручной корректировки значения процента идентичности. Т.е. только положения остатков последовательности запроса вне самых дальних N-и C-концевых остатков исследуемой последовательности. Только положения остатков вне N- и C-концов исследуемой последовательности, определяемые при выравнивании FASTDB, несовпадающие/ невыровненные с последовательностью запроса, корректируют вручную. Другую корректировку вручную не осуществляют в целях по настоящему изобретению.

10 Природные варианты белков называют "аллельными вариантами", и этот термин относится к одной или нескольким альтернативным формам гена, занимающего указанный локус на хромосоме организма (Genes 11, Lewin, B., ed., John Wiley & Sons, New York (1985)). Эти аллельные варианты могут варьироваться на уровне полинуклеотида и/или полипептида. Альтернативно, неприродные варианты можно получать способами мутагенеза или с помощью прямого синтеза.

15 Термин "метка" относится к средствам, способным обеспечивать детектируемый сигнал напрямую или посредством взаимодействия с одной или несколькими дополнительными составляющими системы, продуцирующей сигнал. Метки, детектируемые напрямую, и которые могут найти применение в изобретении, включают флуоресцентные метки. Конкретные флуорофоры включают флуоресцеин, родамин, BODIPY, цианиновые красители и т.п.

20 Термин "флуоресцентная метка" относится к любой метке со способностью испускать свет с конкретной длиной волны при активации светом с другой длиной волны.

Термин "флуоресценция" относится к любой детектируемой характеристике флуоресцентного сигнала, включая интенсивность, спектр, длина волны, внутриклеточное распределение и т.д.

25 Термин "детекция" флуоресценции относится к оценке флуоресценции клетки с использованием качественных или количественных способов. В некоторых из вариантов осуществления настоящего изобретения флуоресценцию будут определять качественно. Другими словами, флуоресцентный маркер либо присутствует, свидетельствуя о том, что рекомбинантный слитый белок экспрессируется, либо нет. В других случаях флуоресценцию можно определять с использованием количественных способов, например, измеряя интенсивность флуоресценции, спектр или внутриклеточное распределение, что делает возможным статистическое сравнение значений, полученных в других условиях. Уровень также можно определять с использованием качественных способов, таких как визуальный анализ и сравнение человеком множества образцов, например, образцов, определяемых с использованием флуоресцентного микроскопа или другого оптического детектора (например, системы анализа изображений и т.д.). Термин "изменение" или "модуляция" флуоресценции относится к любому детектируемому различию интенсивности, внутриклеточного распределения, спектра, длина волны или другой аспект флуоресценции в конкретных условиях по сравнению с другими условиями. Например, "изменение" или "модуляцию" определяют количественно, и различие является статистически значимым различием. Любые "изменения" или "модуляции" флуоресценции можно определять с использованием стандартного инструментария, такого как флуоресцентный микроскоп, CCD или любой другой детектор флуоресценции, и с использованием автоматизированной системы, такой как интегрированные системы, или они могут отражать субъективное определение изменение человеком-наблюдателем.

"Зеленый флуоресцентный белок" (GFP) является белком, состоящим из 238 аминокислот (26,9 кДа), исходно выделенным из медузы *Aequorea victoria/Aequorea*

aequorea/Aequorea forskalea, флуоресцирующим зеленым при воздействии синего света. GFP из *A. victoria* имеет основной пик возбуждения при длине волны 395 нм и минорный пик при 475 нм. Его пик излучения соответствует 509 нм, что находится в нижней зеленой части видимого спектра. GFP из морских анютиных глазок (*Renilla reniformis*) имеет

5 один основной пик возбуждения при 498 нм. Благодаря потенциалу широкого использования и развитию потребностей исследователей сконструировано множество различных мутантов GFP. Первым значительным улучшением являлась одна точечная мутация (S65T,) описанная Roger Tsien в 1995 году в Nature. Эта мутация значительно

10 улучшила спектральные характеристики GFP, приводя к повышенной флуоресценции, фотостабильности и сдвигу основного пика возбуждения к 488 нм, при этом пик излучения сохраняется на уровне 509 нм. Добавление точечной мутации эффективности фолдинга при 37°C (F64L) в его каркас привело к получению усиленного GFP (EGFP). EGFP имеет коэффициент экстинкции (обозначаемый как ϵ), также известный как его

15 оптическое сечение $9,13 \times 10^{-21}$ м²/молекулу, также выраженный как 55000 л/(моль·см). "Superfolder" GFP, серия мутаций, позволяющих GFP быстро сворачиваться и созреть даже при слиянии с плохо сворачивающимися пептидами, описана в 2006 году.

"Желтый флуоресцентный белок" (YFP) является генетическим мутантом зеленого флуоресцентного белка, полученным из *Aequorea victoria*. Его пик возбуждения соответствует 514 нм, а пик излучения - 527 нм.

20 В рамках изобретения, формы в единственном числе включают ссылку на множественное число, если контекст четко не указывает на иное.

"Вирус" является субмикронным возбудителем инфекции, неспособным расти или размножаться вне клетки-хозяина. Каждая вирусная частица, или вирион, состоит из генетического материала ДНК или РНК внутри защитной белковой оболочки, названной

25 капсидом. Форма капсида варьируется от простой спиральной и икосаэдрической (полиэдрической или почти сферической) формы до более сложных структур с хвостами или оболочкой. Вирусы инфицируют клеточные формы жизни, и их классифицируют как вирусы животных, растений и бактерий в соответствии с типом инфицируемого хозяина.

30 В рамках изобретения, термин "транссинаптический вирус" относится к вирусам, способным мигрировать от одного нейрона к другому соединяющемуся нейрону через синапс. Примерами такого транссинаптического вируса являются рабдовирусы, например вирус бешенства, и альфа-герпесвирусы, например, вирус болезни Ауески или вирус простого герпеса. В рамках изобретения, термин "транссинаптический вирус"

35 также включает вирусные субъединицы, сами по себе имеющие способность мигрировать от одного нейрона к другому соединяющемуся нейрону через синапс, и биологические векторы, такие как модифицированные вирусы, включающие такую субъединицу и демонстрирующие способность мигрировать от одного нейрона к другому соединяющемуся нейрону через синапс.

40 Транссинаптическая миграция может быть антероградной или ретроградной. При ретроградной миграции вирус будет перемещаться от постсинаптического нейрона к пресинаптическому нейрону. Таким образом, при антероградной миграции вирус будет перемещаться от пресинаптического нейрона к постсинаптическому нейрону.

Термин "гомологи" относятся к белкам, имеющим общего предка. Аналоги не

45 обладают общим предком, но обладают некоторым функциональным (а не структурным) сходством, заставляющим включать их в один класс (например, трипсин-подобные сериновые протеиназы и субтилизины очевидно неродственны - их структуры вне активного центра полностью различны, но они имеют, по существу, геометрически

идентичные активные центры, и, таким образом, их считают примером конвергентной эволюции аналогов).

5 Существует два подкласса гомологов - ортологи и паралоги. Ортологи являются одинаковыми генами (например, цитохрома с) у разных видов. Два гена в одном организме не могут быть ортологами. Паралоги являются результатом дупликации гена (например, гемоглобин бета и дельта). Если два гена/белка являются гомологичными и находятся в одном организме, они являются паралогами.

В рамках изобретения, термин "нарушение" относится к болезни, заболеванию, клиническому состоянию или патологическому состоянию.

10 В рамках изобретения, термин "фармацевтически приемлемый носитель" относится к среде-носителю, не мешающему эффективности биологической активности активного ингредиента, являющемуся химически инертным и нетоксичным для пациента, которому его вводят.

15 В рамках изобретения, термин "фармацевтически приемлемое производное" относится к любому гомологу, аналогу или фрагменту средства, например, идентифицированному способом скрининга по изобретению, являющемуся относительно нетоксичным для индивидуума.

20 Термин "терапевтическое средство" относится к любой молекуле, соединению или лекарственному средству, способствующему профилактике или лечению нарушений или осложнений нарушений.

Композиции, содержащие такое средство, составленное в совместимом фармацевтическом носителе, можно получать, упаковывать и помечать для лечения.

25 Если комплекс является водорастворимым, то его можно составлять в подходящем буфере, например, фосфатно-солевом буфере или других физиологически совместимых растворах.

30 Альтернативно, если получаемый комплекс имеет плохую растворимость в водных растворителях, то его можно составлять с неионным поверхностно-активным средством, таким как Tween или полиэтиленгликоль. Таким образом, соединения и их физиологически приемлемые сольваты можно составлять для введения посредством ингаляции или инсуффляции (через рот или нос) или посредством перорального, буккального, парентерального, ректального введения или, в случае опухолей, посредством прямой инъекции в солидную опухоль.

35 В случае перорального введения, фармацевтический препарат может находиться в жидкой форме, например, растворов, сиропов или суспензий, или в форме лекарственного продукта для восстановления водой или другим подходящим наполнителем перед использованием. Такие жидкие препараты можно получать общепринятыми способами с использованием фармацевтически приемлемых добавок, таких как суспендирующие средства (например, сорбитовый сироп, производные целлюлозы или гидрогенизированные пищевые жиры); эмульгаторы (например, лецитин 40 или гуммиарабик); неводные наполнители (например, миндальное масло, жирные сложные эфиры или фракционированные растительные масла) и консерванты (например, метил или пропил-р-гидроксibenзоаты или сорбиновая кислота). Фармацевтические композиции могут иметь форму, например, таблеток или капсул, полученных общепринятыми способами с использованием фармацевтически приемлемых 45 эксципиентов, таких как связывающие средства (например, прежелатинизированный кукурузный крахмал, поливинилпирролидон или гидроксипропилметилцеллюлоза); наполнители (например, лактоза, микрокристаллическая целлюлоза или гидроортофосфат кальция); смазочные средства (например, стеарат магния, тальк или

диоксид кремния); разрыхлители (например, картофельный крахмал или крахмалгликолят натрия) или увлажнители (например, лаурилсульфат натрия). Таблетки можно покрывать способами, хорошо известными в этой области.

5 Препараты для перорального введения можно соответствующим образом составлять для достижения контролируемого высвобождения активного соединения.

Соединения можно составлять для парентерального введения посредством инъекции, например, посредством болюсной инъекции или непрерывной инфузии. Составы для инъекций могут находиться в стандартной лекарственной форме, например, в ампулах или многодозовых контейнерах, с добавлением консерванта.

10 Композиции могут иметь такие формы, как суспензии, растворы или эмульсии в масляных или водных наполнителях, и могут содержать вспомогательные средства, такие как суспендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие средства. Альтернативно, активный ингредиент может находиться в порошкообразной форме для восстановления с использованием подходящего наполнителя, например, стерильной
15 воды, не содержащей пирогены, перед использованием.

Соединения также можно составлять для местного применения, например, в виде крема или лосьона.

В дополнение к составам, описанным ранее, соединения также можно составлять как депо-препарат. Такие составы длительного действия можно вводить посредством
20 имплантации (например, внутриглазной, подкожной или внутримышечной) или внутриглазной инъекции.

Таким образом, например, соединения можно составлять с использованием подходящих полимерных или гидрофобных материалов (например, в виде эмульсии в подходящем масле) или ионообменных смол или в виде умеренно растворимых
25 производных, например, умеренно растворимой соли. Липосомы и эмульсии являются хорошо известными примерами средств доставки или носителей для гидрофильных лекарственных средств.

Композиции, при желании, могут находиться в упаковке или диспенсере, который может содержать одну или несколько стандартных лекарственных форм, содержащих
30 активный ингредиент. Упаковка, например, может содержать металлическую или пластиковую фольгу, например, блистерная упаковка. Упаковку или диспенсер можно дополнять инструкциями по введению.

Изобретение также относится к наборам для осуществления схем лечения по изобретению. Такие наборы содержат в одном или нескольких контейнерах
35 терапевтически или профилактически эффективные количества композиций в фармацевтически приемлемой форме.

Композиция в сосуде из набора может находиться в форме фармацевтически приемлемого раствора, например, в комбинации со стерильным физиологическим раствором, раствором декстрозы или забуференным раствором, или другой
40 фармацевтически приемлемой стерильной жидкости. Альтернативно, комплекс можно лиофилизировать или обезвоживать; в этом случае набор, необязательно, дополнительно содержит в контейнере фармацевтически приемлемый раствор (например, физиологический раствор, раствор декстрозы и т.д.), предпочтительно стерильный, для восстановления комплекса для получения раствора для инъекций.

45 В другом варианте осуществления набор дополнительно содержит иглу или шприц, предпочтительно, упакованные в стерильной форме, для инъектирования комплекса, и/или упакованную спиртовую салфетку. Необязательно, включены инструкции для введения композиций лечащими врачами или пациентом.

Палочковые фоторецепторы, палочковидные клетки или палочки являются фоторецепторными клетками в сетчатке глаза, которые могут функционировать при менее интенсивном освещении, чем другой тип зрительных фоторецепторов, колбочковые клетки. Палочки сконцентрированы на внешних краях сетчатки и используются в периферическом зрении. В среднем, в сетчатке человека находится приблизительно 90 миллионов палочковых клеток. Палочковые клетки, более чувствительные, чем колбочковые клетки, почти полностью отвечают за ночное зрение. Однако, т.к. они имеют только один тип светочувствительного пигмента, а не три типа, как в колбочковых клетках человека, палочки играют незначительную, если таковая и имеется, роль в цветном зрении.

Если не определено иначе, все технические и научные термины, используемые в настоящем описании, имеют значение, общепринято понимаемое специалистами в области, к которой принадлежит изобретение. Хотя в практическом осуществлении или тестировании настоящего изобретения можно использовать способы и материалы, схожие или эквивалентные способам и материалам, представленным в настоящем описании, подходящие способы и материалы описаны ниже. В случае противоречия, настоящее описание, включающее определения, будет обладать приоритетом. Кроме того, материалы, способы и примеры являются исключительно иллюстративными, а не ограничивающими.

20 ПРИМЕРЫ

Генная конструкция

Получали полногеномные карты метилирования ДНК высокого разрешения в интересующем типе клеток (палочках) для идентификации регуляторных областей-кандидатов. Эхансеры-кандидаты выбирали с учетом наличия гипометилирования ДНК, специфического для типа клеток. Выбранные таким образом элементы подвергали скринингу на экспрессию с использованием высокопроизводительного репортерного анализа *in vivo* в колбочках и палочках. Затем специфичные для палочек элементы последовательности синтезировали и клонировали перед последовательностью минимального промотора ATCCTCACATGGTCTGCTGGAGTTAGTAGAGGGTATAT AATGGAAGCTCGACTTCCAGCTATCACATCCACTGTGTTGTTGTGAAGTGAATCCA STATAGGCCA (SEQ ID NO: 2). Кодировующую последовательность ChR2-eGFP встраивали непосредственно после этого промотора и оптимизированной последовательностью Козак (GCCACC) с последующим посттранскрипционным регуляторным элементом вируса гепатита лесного сурка (WPRE) и участком полиаденилирования SV40. На нейроны сетчатки направленно воздействовали с использованием AAV серотипа 2/8 с титром в диапазоне от 3,43E+11 до 1,75E+12 GC/мл.

Вирусная трансфекция и препарат ткани

В случае введения AAV глаза анестезированных животных прокалывали в области склеры вблизи хрусталика с помощью остроконечной иглы 30 калибра. 2 мкл суспензии частиц AAV инъецировали субретинально с помощью шприца Гамильтона. Через 3 недели выделенные сетчатки фиксировали в течение 30 мин в 4% PFA в PBS с последующей стадией промывки в PBS при 4°C. Целые сетчатки обрабатывали 10% нормальной сывороткой осла (NDS), 1% BSA, 0,5% тритона X-100 в PBS в течение 1 ч. при комнатной температуре. Обработку моноклональным антителом крысы против GFP (Molecular Probes Inc.; 1:500) и поликлональным антителом кролика против аррестина колбочек мыши (Millipore: 1:200) в 3% NDS, 1% BSA, 0,5% тритона X-100 в PBS осуществляли в течение 5 дней при комнатной температуре. Обработку вторичным Ab осла против крысы с Alexa Fluor-488 (Molecular Probes Inc.; 1:200), антителом против

кролика с Alexa Fluor-633 и Хехст осуществляли в течение 2 ч. Срезы промывали, заливали препятствующим выгоранию реагентом ProLong (Molecular Probes Inc.) на предметных стеклах и фотографировали с использованием лазерного сканирующего конфокального микроскопа Zeiss LSM 700 Axio Imager Z2 (Carl Zeiss Inc.).

5

(57) Формула изобретения

1. Экспрессирующая кассета, содержащая выделенную молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую или состоящую из последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1, функционально связанную по меньшей мере с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей ген, где указанная выделенная молекула нуклеиновой кислоты является эффективной для направления экспрессии гена в клетке палочкового фоторецептора.

10

2. Экспрессирующая кассета по п.1, дополнительно содержащая минимальный промотор, например минимальный промотор SEQ ID NO: 2.

15

3. Экспрессирующая кассета по п.1 или 2, где продукт указанного гена является светочувствительной молекулой, например галородопсином или канальным родопсином.

4. Вектор, содержащий экспрессирующую кассету по любому из пп.1-3, предназначенный для экспрессии указанного гена в клетке палочкового фоторецептора.

5. Вектор по п.4, где указанный вектор является вирусным вектором.

20

6. Вектор по п.4, где указанный вектор представляет собой вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV).

7. Применение экспрессирующей кассеты по любому из пп.1-3 для экспрессии указанного гена в клетке палочкового фоторецептора.

25

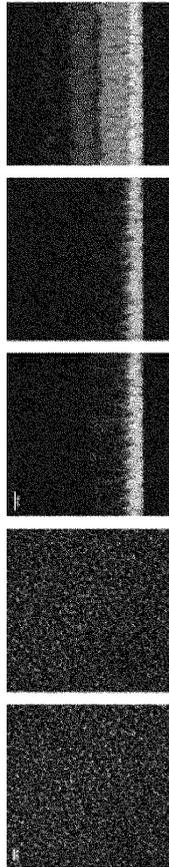
8. Способ экспрессии гена в клетке палочкового фоторецептора, включающий трансфекцию выделенной клетки, линии клеток или популяции клеток с использованием экспрессирующей кассеты по любому из пп.1-3, где указанная выделенная клетка является клеткой палочкового фоторецептора или указанные линия клеток или популяция клеток содержат клетку палочкового фоторецептора.

30

35

40

45



ФИГ.1