

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202092015 (13) A1

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2021.02.15(51) Int. Cl. C07K 14/005 (2006.01)  
C12N 15/864 (2006.01)(22) Дата подачи заявки  
2019.02.27

## (54) НОВЫЕ ВЕКТОРЫ НА ОСНОВЕ АДЕНОАССОЦИИРОВАННОГО ВИРУСА (AAV), ВЕКТОРЫ AAV, СО СНИЖЕННЫМ ДЕЗАМИДИРОВАНИЕМ КАПСИДА, А ТАКЖЕ ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 62/635,964; 62/635,968; 62/663,788; 62/663,797;  
62/667,587; 62/667,888; 62/667,881; 62/677,471;  
62/677,474; 62/667,585; 62/703,670; 62/703,673;  
62/722,382; 62/722,388(32) 2018.02.27; 2018.02.27; 2018.04.27; 2018.04.27;  
2018.05.06; 2018.05.07; 2018.05.07; 2018.05.29;  
2018.05.29; 2018.05.29; 2018.07.26; 2018.07.26;  
2018.08.24; 2018.08.24

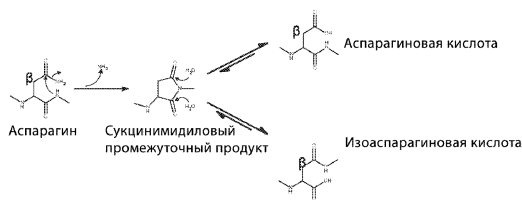
(33) US

(86) PCT/US2019/019861

(87) WO 2019/169004 2019.09.06

(71) Заявитель:  
ДЗЕ ТРАСТИЗ ОФ ДЗЕ  
ЮНИВЕРСИТИ ОФ  
ПЕНСИЛЬВАНИЯ (US)(72) Изобретатель:  
Уилсон Джеймс М., Тип Эйприл,  
Тернер Кевин, Симс Джошуа  
Джойнер, Ван Цян (US)(74) Представитель:  
Медведев В.Н. (RU)

(57) Вектор на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), содержащий капсид аденоассоциированного вируса, имеющий гетерогенную популяцию белков vp1, гетерогенную популяцию белка vp2 и гетерогенную популяцию белков vp3. Капсид содержит модифицированные аминокислоты по сравнению с кодируемой аминокислотной последовательностью VP1, капсид, содержащий сильно дезамидированные остатки аспарагина в паре аспарагин-глицин и дополнительно содержащий множество других, менее дезамидированных остатков аспарагина и, необязательно, глутамина.



A1

202092015

202092015

A1

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-564566EA/061

### **НОВЫЕ ВЕКТОРЫ НА ОСНОВЕ АДЕНОАССОЦИИРОВАННОГО ВИРУСА (AAV), ВЕКТОРЫ AAV, СО СНИЖЕННЫМ ДЕЗАМИДИРОВАНИЕМ КАПСИДА, А ТАКЖЕ ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**

**ЗАЯВЛЕНИЕ ОБ ИССЛЕДОВАНИИ, ФИНАНСИРУЕМОМ ЗА СЧЕТ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТА**

Это изобретение было выполнено при государственной поддержке в рамках P01HL059407, предоставленного Национальным институтом здравоохранения. Государство имеет определенные права на изобретение.

**ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ, ПРЕДСТАВЛЕННЫЙ ЧЕРЕЗ EFS-WEB**

Текстовое содержимое перечня последовательностей под названием «18-8592PCT\_Sequence\_Listing\_ST25», созданного 27 февраля 2019 года и представленного в электронном виде через EFS-Web, вместе с приложением полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

#### **УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ**

Капсид аденоассоциированного вируса (AAV) представляет собой икосаэдр по структуре и состоит из 60 мономеров вирусного белка (VP) (VP1, VP2 и VP3) в соотношении 1:1:10 (Xie Q, et al. Proc Natl Acad Sci USA. 2002; 99(16):10405-10). Полная последовательность белка VP3 (~535aa) содержится в пределах С-конца как VP1, так и VP2, а общие последовательности VP3 в первую очередь ответственны за общую структуру капсида. Вследствие структурной гибкости уникальных областей VP1/VP2 и низкого представительства мономеров VP1 и VP2 по сравнению с мономерами VP3 в собранном капсиде, VP3 является единственным капсидным белком, который можно определить с помощью рентгеновской кристаллографии (Nam HJ, et al. J Virol. 2007; 81(22):12260-71). VP3 содержит девять гипервариабельных областей (HVR), которые являются первичным источником вариабельности последовательностей между серотипами AAV (Govindasamy L, et al. J Virol. 2013; 87(20):11187-99). Учитывая их гибкость и расположение на поверхности капсида, HVR в значительной степени ответственны за взаимодействия с клетками-мишенями, а также с иммунной системой (Huang LY, et al. J Virol. 2016; 90(11):5219-30; Raupp C, et al. J Virol. 2012; 86(17):9396-408). Хотя структуры ряда серотипов опубликованы (ID Базы данных структуры белков (PDB) 1LP3, 4RSO, 4V86, 3UX1, 3KIC, 2QA0, 2G8G из базы данных Исследовательской коллаборации структурной биоинформатики (RCSB)), для структурных записей AAV2, AAVrh.8, AAV6, AAV9, AAV3B, AAV8 и AAV4, соответственно, в литературе очень мало информации, касающейся модификаций на поверхности этих капсидов. Исследование свидетельствует, что внутриклеточное фосфорилирование капсида происходит по определенным остаткам тирозина (Zhong L, et al. Virology. 2008; 381(2):194-202). Несмотря на предполагаемые сайты гликозилирования в первичной последовательности

VP3, событий гликозилирования в AAV2 не выявлено (Murray S, et al. *J Virol*. 2006; 80(12):6171-6; Jin X, et al. *Hum Gene Ther Methods*. 2017; 28(5):255-267); другие серотипы AAV еще не оценивались по гликозилированию капсида.

Векторы AAV для генной терапии подверглись меньшей проверке на молекулярном уровне, которая обычно сопровождает разработку и производство терапевтических рекомбинантных белков. Посттрансляционные модификации (PTM) капсида AAV в значительной степени не исследованы, поэтому, соответственно, мало известно об их способности влиять на функцию или о стратегиях контроля уровней PTM в изготовленных AAV для терапии.

Вариации посттрансляционных модификаций белковых терапевтических средств, не связанных с генной терапией, усложнили их разработку в качестве лекарств. Jenkins, N, Murphy, L, and Tyther, R (2008). Post-translational modifications of recombinant proteins: significance for biopharmaceuticals. *Mol Biotechnol* 39: 113-118; Houde, D, Peng, Y, Berkowitz, SA, and Engen, JR (2010). Post-translational modifications differentially affect IgG1 conformation and receptor binding. *Mol Cell Proteomics* 9: 1716-1728. Например, дезамидирование выбранных аминокислот модулирует стабильность и иммунный ответ на рекомбинантную вакцину против сибирской язвы на основе защитного антигена. (Powell BS, et al. *Proteins*. 2007; 68(2):458-79; Verma A, et al. *Clin Vaccine Immunol*. 2016; 23(5):396-402). В некоторых случаях этот процесс катализируется вирусными или бактериальными дезамидазами, чтобы модулировать сигнальные пути клетки-хозяина или врожденные иммунные ответы (Zhao J, et al. *J Virol*. 2016; 90(9):4262-8; Zhao J, et al. *Cell Host Microbe*. 2016; 20(6):770-84). Чаще эндогенное дезамидирование представляет собой независимый от ферментов спонтанный процесс. Хотя функция спонтанного дезамидирования до конца не выяснена, предыдущие исследования показали, что это событие служит молекулярными часами, показывающими относительный возраст белка и регулируемыми его обновлением (Robinson NE and Robinson AB. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98(3):944-9).

Дезамидирование происходит, когда амидная группа аспарагина или, реже, глутамина подвергается нуклеофильной атаке со стороны соседнего атома азота, и амидная группа теряется. Этот процесс приводит к промежуточному сукцинимидилу (Yang H and Zubarev RA. *Electrophoresis*. 2010; 31(11):1764-72), который в результате гидролиза разделяется на смесь аспарагиновой кислоты и изоаспарагиновой кислоты (или глутаминовой кислоты и изоглутаминовой кислоты) (Catak S, et al. *J Phys Chem A*. 2009; 113(6):1111-20). Исследования коротких синтетических пептидов показывают, что этот гидролиз приводит к получению смеси изоаспарагиновой кислоты и аспарагиновой кислоты в соотношении 3:1 (Geiger T. and Clarke S. *J Biol Chem*. 1987; 262(2):785-94).

По-прежнему существует потребность в композициях, содержащих конструкции на основе AAV, для доставки гетерологичных молекул, которые имеют стабильное связывание с рецептором и/или стабильные капсиды, избегают нейтрализации антител и/или сохраняют чистоту при хранении.

## РАСКРЫТИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В одном из вариантов воплощения предложена композиция, которая включает смешанную популяцию рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), причем каждый из указанных rAAV содержит: (а) капсид AAV, содержащий приблизительно 60 капсидных белков vp1, белков vp2 и белков vp3, при этом белки vp1, vp2 и vp3 представляют собой: гетерогенную популяцию белков vp1, которые продуцируются из последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей выбранную аминокислотную последовательность vp1 AAV, гетерогенную популяцию белков vp2, которые продуцируются из последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей выбранную аминокислотную последовательность vp2 AAV, гетерогенную популяцию белков vp3, которые продуцируются из последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей выбранную аминокислотную последовательность vp3 AAV, где: белки vp1, vp2 и vp3 содержат субпопуляции с аминокислотными модификациями, включая по меньшей мере два сильно дезамидированных аспарагина (N) в парах аспарагин-глицин в капсиде AAV и, необязательно, дополнительно включая субпопуляции, содержащие другие дезамидированные аминокислоты, в которых дезамидирование приводит к изменению аминокислоты; и (б) векторный геном в капсиде AAV, причем векторный геном содержит молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую последовательности инвертированных концевых повторов AAV, и последовательность нуклеиновой кислоты, не являющуюся AAV, кодирующую продукт, функционально связанный с последовательностями, которые направляют экспрессию продукта в клетке-хозяине.

В некоторых вариантах воплощения дезамидированные аспарагины дезамидированы до аспарагиновой кислоты, изоаспарагиновой кислоты, взаимопревращающейся пары аспарагиновая кислота/изоаспарагиновая кислота или их комбинаций. В некоторых вариантах воплощения капсид дополнительно содержит дезамидированный(е) глутамин(ы), который(е) дезамидирован(ы) до (α)-глутаминовой кислоты, γ-глутаминовую кислоту, взаимопревращающуюся пару (α)-глутаминовая кислота/γ-глутаминовая кислота или их комбинацию.

В дополнительном аспекте предложен рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV), который содержит: (A) капсид AAVrh79, содержащий одно или более из: (1) капсидных белков AAVrh79, содержащих: гетерогенную популяцию белков vp1 AAVrh79, выбранных из: белков vp1, полученных путем экспрессии из последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует predetermined аминокислотную последовательность от 1 до 738 из SEQ ID NO:2, белков vp1, полученных из SEQ ID NO:1, или белков vp1, полученных из последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 70% идентичной SEQ ID NO:1, которая кодирует predetermined аминокислотную последовательность от 1 до 738 SEQ ID NO:2, гетерогенной популяции белков vp2 AAVrh79, выбранных из: белков vp2, полученных путем экспрессии из последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует predetermined аминокислотную последовательность, по меньшей мере, приблизительно из аминокислот 138-738 из SEQ ID NO:2, белков vp2, полученных из

последовательности, содержащей, по меньшей мере, нуклеотиды от 412 до 2214 SEQ ID NO:1, или белков vp2, полученных из последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 70% идентичной по меньшей мере нуклеотидам от 412 до 2214 SEQ ID NO:1, которая кодирует predetermined аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно из аминокислот от 138 до 738 из SEQ ID NO:2, гетерогенной популяции белков vp3 AAVrh79, выбранных из: белков vp3, полученных путем экспрессии из последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует predetermined аминокислотную последовательность по меньшей мере из приблизительно 204-738 аминокислот из SEQ ID NO:2, белков vp3, полученных из последовательности, содержащей по меньшей мере нуклеотиды с 610 по 2214 SEQ ID NO:1, или белков vp3, полученных из последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 70% идентичной по меньшей мере нуклеотидам от 610 до 2214 SEQ ID NO:1, которые кодирует predetermined аминокислотную последовательность, по меньшей мере, приблизительно из аминокислот от 204 до 738 из SEQ ID NO:2; и/или (2) гетерогенной популяции белков vp1, которые являются продуктом последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, гетерогенной популяции белков vp2, которые являются продуктом последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно из аминокислот 138-738 из SEQ ID NO: 2, гетерогенной популяции белков vp3, которые являются продуктом последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей по меньшей мере аминокислоты от 204 до 738 из SEQ ID NO:2, где белки vp1, vp2 и vp3 содержат субпопуляции с аминокислотными модификациями, включающими по меньшей мере два сильно дезамидированных аспарагина (N) в парах аспарагин-глицин в SEQ ID NO: 2 и, необязательно, дополнительно включая субпопуляции, содержащие другие дезамидированные аминокислоты, где дезамидирование приводит к изменению аминокислоты; и (B) векторный геном в капсиде AAVrh79, причем векторный геном содержит молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую последовательности инвертированных концевых повторов AAV, и последовательность нуклеиновой кислоты, не относящуюся к AAV, кодирующую продукт, функционально связанный с последовательностями, которые направляют экспрессию продукта в клетке-хозяине.

В другом аспекте предложен способ трансдукции ткани-мишени. В одном из вариантов воплощения способ включает введение AAV, имеющего капсид AAVrh79, как описано в данном документе. В еще одном из вариантов воплощения предложен способ трансдукции ткани печени, включающий введение AAV, имеющего капсид AAVrh79. В другом варианте воплощения предложен способ трансдукции мышечной ткани, включающий введение AAV, имеющего капсид AAVrh79.

В еще одном аспекте предложен способ уменьшения дезамидирования капсида AAVrh79. В одном из вариантов воплощения способ включает получение капсида AAVrh79 из последовательности нуклеиновой кислоты, содержащей модифицированные

кодона VP AAVrh79, последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую независимо модифицированные кодоны глицина в одной-четырех парах аспарагин-глицин, расположенных в позициях N57, N263, N385 и/или N514 в SEQ ID NO: 2, таким образом что модифицированный кодон кодирует аминокислоту, отличную от глицина. В другом варианте воплощения способ включает получение капсида AAVrh79 из последовательности нуклеиновой кислоты, содержащей модифицированные кодоны vp AAVrh79, последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую независимо модифицированные кодоны глицина в одной-четырех парах аспарагин-глицин, расположенных в позициях N94, N254, N305, N410 и/или N479 в SEQ ID NO: 2.

В дополнительном варианте воплощения предложен rAAV8.AR2.08, который содержит: (A) капсид AAV8.AR2.08, содержащий одно или более из: (1) капсидных белков AAV8.2.08, содержащих: гетерогенную популяцию белков vp1 AAV8.AR2.08, выбранных из: белков vp1, полученных путем экспрессии из последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует предопределенную аминокислотную последовательность от 1 до 738 из SEQ ID NO: 18, белков vp1, полученных из SEQ ID NO:17, или белков vp1, полученных из последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 70% идентичной SEQ ID NO:17, которая кодирует предопределенную аминокислотную последовательность от 1 до 738 SEQ ID NO:18, гетерогенной популяции белков vp2 AAV8.AR2.08, выбранных из: белков vp2 AAV8.AR2.08, полученных путем экспрессии из последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует предопределенную аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно из аминокислот 138-738 из SEQ ID NO:18, белков vp2, полученных из последовательности, содержащей, по меньшей мере, нуклеотиды от 411 до 2214 SEQ ID NO:17, или белков vp2, полученных из последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 70% идентичной по меньшей мере нуклеотидам от 412 до 2214 SEQ ID NO:17, которая кодирует предопределенную аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно из аминокислот от 138 до 738 из SEQ ID NO:18, гетерогенной популяции белков vp3 AAV8.AR2.08, выбранных из: белков vp3, полученных путем экспрессии из последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует предопределенную аминокислотную последовательность по меньшей мере из приблизительно 204-738 аминокислот из SEQ ID NO:18, белков vp3, полученных из последовательности, содержащей по меньшей мере нуклеотиды с 607 по 2214 SEQ ID NO:17, или белков vp3, полученных из последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 70% идентичной по меньшей мере нуклеотидам от 607 до 2214 SEQ ID NO:17, которая кодирует предопределенную аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно из аминокислот от 204 до 738 из SEQ ID NO:18; и/или (2) гетерогенной популяции белков vp1, которые являются продуктом последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, гетерогенной популяции белков vp2, которые являются продуктом последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотную последовательность по меньшей мере

мере приблизительно из аминокислот 138-738 из SEQ ID NO: 18, и гетерогенной популяции белков vp3, которые являются продуктом последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей по меньшей мере аминокислоты от 204 до 738 из SEQ ID NO:18, где белки vp1, vp2 и vp3 содержат субпопуляции с аминокислотными модификациями, включающими по меньшей мере два сильно дезамидированных аспарагина (N) в парах аспарагин-глицин в SEQ ID NO: 18 и, необязательно, дополнительно включая субпопуляции, содержащие другие дезамидированные аминокислоты, где дезамидирование приводит к изменению аминокислоты; и (Б) векторный геном в капсиде AAV8.AR2.08, причем векторный геном содержит молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую последовательности инвертированных концевых повторов AAV, и последовательность нуклеиновой кислоты, не относящуюся к AAV, кодирующую продукт, функционально связанный с последовательностями, которые направляют экспрессию продукта в клетке-хозяине.

В другом аспекте предложен способ трансдукции ткани-мишени. В одном из вариантов воплощения способ включает введение AAV, имеющего капсид AAV8.AR2.08, как описано в данном документе. В одном из вариантов воплощения предложен способ трансдукции ткани печени, включающий введение AAV, имеющего капсид AAV8.AR2.08. В другом варианте воплощения предложен способ трансдукции мышечной ткани, включающий введение AAV, имеющего капсид AAV8.AR2.08.

В еще одном аспекте предложен способ уменьшения дезамидирования капсида AAV8.AR2.08. В одном из вариантов воплощения способ включает получение капсида AAV8.AR2.08 из последовательности нуклеиновой кислоты, содержащей модифицированные кодоны vp AAV8.AR2.08, последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую независимо модифицированные кодоны глицина в одной-четырех парах аспарагин-глицин, расположенных в позициях N57, N263, N385, N514 и/или N540 в SEQ ID NO: 18, таким образом что модифицированный кодон кодирует аминокислоту, отличную от глицина. В другом варианте воплощения способ включает получение капсида AAV8.AR2.08 из последовательности нуклеиновой кислоты, содержащей модифицированные кодоны vp AAV8.AR2.08, последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую независимо модифицированные кодоны глицина в одной-четырех парах аспарагин-глицин, расположенных в позициях N94, N254, N305, N521, N590, Q601, N653 и/или N665 в SEQ ID NO: 18.

В некоторых вариантах воплощения предложен гAAV5.5.9, который содержит: (А) капсид AAV5.5.9, содержащий одно или более из: (1) капсидных белков AAVG5, содержащих: гетерогенную популяцию белков vp1 AAV5.5.9, выбранных из: белков vp1, полученных путем экспрессии из последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует predetermined аминокислотную последовательность от 1 до 736 из SEQ ID NO: 10, белков vp1, полученных из SEQ ID NO:9, или белков vp1, полученных из последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 70% идентичной SEQ ID NO:9, которая кодирует predetermined аминокислотную последовательность от 1 до

736 SEQ ID NO:1, гетерогенной популяции белков vp2 AAV5.5.9, выбранных из: белков vp2 AAVG5, полученных путем экспрессии из последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует predetermined аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно из аминокислот 138-736 из SEQ ID NO:10, белков vp2, полученных из последовательности, содержащей по меньшей мере нуклеотиды от 412 до 2211 SEQ ID NO:9, или белков vp2, полученных из последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 70% идентичной по меньшей мере нуклеотидам от 412 до 2211 SEQ ID NO:9, которая кодирует predetermined аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно из аминокислот от 138 до 736 из SEQ ID NO:10, гетерогенной популяции белков vp3 AAV5.5.9, выбранных из: белков vp3 AAV5.5.9, полученных путем экспрессии из последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует predetermined аминокислотную последовательность по меньшей мере из приблизительно 203-736 аминокислот из SEQ ID NO:10, белков vp3, полученных из последовательности, содержащей по меньшей мере нуклеотиды с 607 по 2211 SEQ ID NO:9, или белков vp3, полученных из последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 70% идентичной по меньшей мере нуклеотидам от 607 до 2211 SEQ ID NO:9, которая кодирует predetermined аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно из аминокислот от 203 до 736 из SEQ ID NO:10; и/или (2) гетерогенной популяции белков vp1, которые являются продуктом последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, гетерогенной популяции белков vp2, которые являются продуктом последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно из аминокислот 138-736 из SEQ ID NO: 10, гетерогенной популяции белков vp3, которые являются продуктом последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей по меньшей мере аминокислоты от 203 до 726 из SEQ ID NO:10, где белки vp1, vp2 и vp3 содержат субпопуляции с аминокислотными модификациями, включающими по меньшей мере два сильно дезамидированных аспарагина (N) в парах аспарагин-глицин в SEQ ID NO: 10 и, необязательно, дополнительно включая субпопуляции, содержащие другие дезамидированные аминокислоты, где дезамидирование приводит к изменению аминокислоты; и (Б) векторный геном в капсиде AAV5.5.9, причем векторный геном содержит молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую последовательности инвертированных концевых повторов AAV, и последовательность нуклеиновой кислоты, не относящуюся к AAV, кодирующую продукт, функционально связанный с последовательностями, которые направляют экспрессию продукта в клетке-хозяине.

В другом аспекте предложен способ трансдукции ткани-мишени. В одном из вариантов воплощения способ включает введение AAV, имеющего капсид AAV5.5.9, как описано в данном документе. В еще одном из вариантов воплощения предложен способ трансдукции ткани печени, включающий введение AAV, имеющего капсид AAV5.5.9. В другом варианте воплощения предложен способ трансдукции мышечной ткани,

включающий введение AAV, имеющего капсид AAV5.5.9.

В еще одном аспекте предложен способ уменьшения дезамидирования капсида AAV5.5.9. В одном из вариантов воплощения способ включает получение капсида AAV5.5.9 из последовательности нуклеиновой кислоты, содержащей модифицированные кодоны *vr* AAV5.5.9, последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую независимо модифицированные кодоны глицина в одной-четырех парах аспарагин-глицин, расположенных в позициях N57, N319, N442 и/или N502 в SEQ ID NO: 10, таким образом что модифицированный кодон кодирует аминокислоту, отличную от глицина. В другом варианте воплощения способ включает получение капсида AAV5.5.9 из последовательности нуклеиновой кислоты, содержащей модифицированные кодоны *vr* AAV5.5.9, при этом, последовательность нуклеиновой кислоты содержит независимо модифицированные кодоны глицина в одной-четырех парах аспарагин-глицин, расположенных в позициях N35, N113, N204, N217, N243, N249, N293/294, N304, N399/400, N505, Q589, N618, N641, N653, N658 и/или N699 в SEQ ID NO: 10.

В другом аспекте предложена композиция, содержащая смешанную популяцию рекомбинантных AAVrh79, AAV8.AR2.08 или AAV5.5.9, как описано в данном документе.

В еще одном аспекте предложен рекомбинантный AAV (rAAV), как описано в данном документе, для доставки желаемого генного продукта нуждающемуся в этом субъекту.

В другом аспекте предложена система получения rAAV, которая используется для получения rAAV, как описано в данном документе. В одном из вариантов воплощения система включает: (а) последовательность нуклеиновой кислоты капсида AAVrh79, AAV8.AR2.08 или AAV5.5.9, кодирующую predetermined аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 10 или 18; (б) молекулу нуклеиновой кислоты, подходящую для упаковки в капсид AAV, при этом указанная молекула нуклеиновой кислоты содержит по меньшей мере один инвертированный концевой повтор AAV (ITR) и последовательность нуклеиновой кислоты, не являющейся AAV, кодирующую продукт гена, функционально связанный с последовательностями, которые направляют экспрессию продукта в клетке-хозяине; и (в) достаточное количество репродуктивных функций и вспомогательных функций AAV, позволяющих упаковывать молекулу нуклеиновой кислоты в рекомбинантный капсид AAV.

Эти и другие аспекты изобретения будут очевидны из следующего подробного описания изобретения.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

ФИГ. 1А - ФИГ. 1G. Электрофоретический анализ изоформ VP AAV8. (ФИГ. 1А) Схема, иллюстрирующая механизм, по которому остатки аспарагина подвергаются нуклеофильной атаке соседними атомами азота, образуя сукцинимидовый промежуточный продукт. Этот промежуточный продукт затем подвергается гидролизу, распадаясь на смесь аспарагиновой кислоты и изоаспарагиновой кислоты. Бета-углерод

обозначен как таковой. Схема была создана в BIOVIA Draw 2018. (ФИГ. 1B) 1 мкг вектора AAV8 пропускали через денатурирующий одномерный SDS-PAGE. (ФИГ. 1C) Показаны изоэлектрические точки для пятен pI маркера карбоангидразы. (ФИГ. 1D) 5 мкг вектора AAV8 анализировали с помощью двумерного гель-электрофореза и окрашивали синим кумасси. Пятна 1-20 представляют собой маркеры pI карбамилированной карбоангидразы. Области, выделенные прямоугольником, представлены ниже: а обозначает VP1, b обозначает VP2, с обозначает VP3, d показывает внутренний маркер тропомиозина (стрелка указывает на пятно тропомиозина при MW=33 кДа, pI=5,2). Изоэлектрическая фокусировка выполнялась в диапазоне pI 4-8. ФИГ. 1E - ФИГ. 1G) Результаты изоэлектрической фокусировки, выполненной в диапазоне pI 4-8. 1e11 GC вектора wtAAV8 (ФИГ. 1E) или мутантного вектора (ФИГ. 1F и ФИГ. 1G), которые анализировали методом 2D гель-электрофореза и окрашивали Sypro Ruby. Маркировка белков: А обозначает VP1; В обозначает VP2; С обозначает VP3, D показывает маркер кональбумина куриного яичного белка, Е обозначает маркер турбонуклеазы. Изоэлектрическая фокусировка выполнялась в диапазоне pI 6-10. Пятна первичной изоформы VP1/2/3 обведены кружком, а расстояние миграции основных пятен маркеров указано вертикальными линиями (турбонуклеаза обозначена пунктирной линией, кональбумин обозначен сплошной линией).

ФИГ. 2A - ФИГ. 2E. Анализ дезамидирования аспарагина и глутамина в капсидных белках AAV8. (ФИГ. 2A - ФИГ. 2B) Показаны масс-спектрометрия с ионизацией электрораспылением (ESI) и теоретические и наблюдаемые массы пептида 3+ (93-103), содержащего Asn-94 (ФИГ. 2A) и Asp-94 (ФИГ. 2B). (ФИГ. 2C - ФИГ. 2D) Показаны масс-спектрометрия с ионизацией электрораспылением (ESI) и теоретические и наблюдаемые массы пептида 3+ (247-259), содержащего Asn-254 (ФИГ. 2C) и Asp-254 (ФИГ. 2D). Наблюдаемые смещения массы для Asn-94 и Asn-254 составили 0,982 Да и 0,986 Да, соответственно, по сравнению с теоретическим смещением массы 0,984 Да. (ФИГ. 2E) Процент дезамидирования по конкретным представляющим интерес остаткам аспарагина и глутамина показан для триптических пептидов AAV8, очищенных различными способами. Столбцы, указывающие на дезамидирование остатков аспарагина с помощью N+1 глицинов, заштрихованы. Были включены остатки, которые, как было установлено, являются дезамидированными по меньшей мере на 2% в по меньшей мере одном проанализированном препарате. Данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение.

ФИГ. 3A - ФИГ. 3E. Структурное моделирование мономера VP3 AAV8 и анализ дезамидированных сайтов. (ФИГ. 3A) Мономер VP3 AAV8 (идентификатор PDB: 3RA8) показан в виде спирали. Цвет ленты указывает на относительную степень гибкости (синий обозначает наиболее жесткий/нормальный температурный фактор, красный обозначает наиболее гибкий/высокотемпературный фактор). Сферы указывают на остатки, представляющие интерес. Расширенные схемы представляют собой шары и стержни, представляющие интересующие остатки и окружающие их остатки, чтобы

продемонстрировать локальную структуру белка (синий обозначает азот, красный обозначает кислород). Подчеркнутые остатки являются NG мотивами. ФИГ. 3В - ФИГ. 3Е: Показаны изоаспарагиновые модели дезамидированных аспарагинов с N+1 глицинами. Карта электронной плотности 2FoFc (уровень 1 сигма), созданная в результате уточнения кристаллической структуры AAV8 (PDB ID: 3RA8) с (ФИГ.3В) аспарагиновой моделью N410 по сравнению с моделями изоаспарагиновой кислоты (ФИГ. 3С) N263, (ФИГ. 3D) N514 и (ФИГ. 3Е) N540. Карта электронной плотности показана в сетке пурпурного цвета. Бета-углерод обозначен как таковой. Стрелка указывает электронную плотность, соответствующую группе R интересующего остатка.

ФИГ. 4А - ФИГ. 4D. Определение факторов, влияющих на дезамидирование капсида AAV8. Препарат AAV8 (ФИГ. 4А) инкубировали при 70°C в течение трех или семи дней (ФИГ. 4В), подвергали воздействию pH 2 или pH 10 в течение семи дней или (ФИГ. 4С) подготавливали для масс-спектрометрии с использованием D<sub>2</sub>O вместо H<sub>2</sub>O для определения возможных источников дезамидирования, не свойственных образованию капсида AAV. (ФИГ. 4D) Дот-блот вектора, обработанного как на ФИГ. 4А с использованием антитела В1 (реагирует на денатурированный капсид) и антитела, специфичного к конформации AAV8 (реагирует на интактные капсиды), для оценки структурной целостности капсида.

ФИГ. 5А - ФИГ. 5В. Частоты дезамидирования в белках, не относящихся к AAV. Процент дезамидирования показан для двух рекомбинантных белков, не относящихся к AAV, содержащих мотивы NG, которые могут быть дезамидированы, карбоангидраза человека (ФИГ. 5А) и фенилаланин-гидроксилаза крысы (ФИГ. 5В) для сравнения с процентами дезамидирования AAV.

ФИГ. 6. Сравнение процента дезамидирования AAV8, рассчитанного с использованием процессов анализа данных от двух учреждений. Процент дезамидирования по конкретным представляющим интерес остаткам аспарагина и глутамина показан для триптических пептидов AAV8, оцененных в двух различных учреждениях.

ФИГ. 7А - ФИГ. 7С иллюстрируют функциональные замены аспарагина в сайтах, не являющихся NG, с высокой вариабельностью между партиями. (ФИГ. 7А) Титры wtAAV8 и мутантных векторов получали с помощью мелкомасштабной тройной трансфекции в клетках 293, как измеряли с помощью количественной ПЦР (кПЦР). Титры указаны относительно контроля wtAAV8. Эффективность трансдукции измеряли, как описано на ФИГ. 8В. Титры и эффективность трансдукции нормализованы к значению для контроля wtAAV8. (ФИГ. 7В) Типичные изображения люциферазы на 14 день после инъекции показаны для мышей, получавших вектор wtAAV8.CB7.ffluc и мутантный капсидный вектор N499Q. (ФИГ. 7С) Экспрессию люциферазы на 14 день периодов исследования от мышей C57BL/6, которым внутривенно вводили wtAAV8 или мутантные векторы (n=3 или 4), измеряли с помощью визуализации люциферазы и указывали в единицах общего потока. Все данные представлены как среднее значение+стандартное

отклонение.

ФИГ. 8А и ФИГ. 8В демонстрируют результаты анализа *in vitro* воздействия генетического дезамидирования на характеристики вектора. (ФИГ. 8А) Титры wtAAV8 и мутантных векторов с генетическим дезамидированием, полученных с помощью мелкомасштабной тройной трансфекции в клетках 293, по данным количественной ПЦР (кПЦР). Титры указаны относительно контроля wtAAV8. Сайты NG с высоким уровнем дезамидирования (столбцы с паттерном), сайты с низким уровнем дезамидирования (белые столбцы) и сайты с высокой вариабельностью (черные столбцы) представлены с wtAAV8 и отрицательным контролем. (ФИГ. 8В) Эффективность трансдукции мутантных векторов AAV8, продуцирующих люциферазу светлячка, представлена по сравнению с контролем wtAAV8. Эффективность трансдукции измеряется в единицах люминесценции, генерируемых на каждый GC, добавленный к клеткам HUH7, и определяется путем проведения трансдукций с неочищенным вектором при нескольких разведениях. Данные по эффективности трансдукции нормализованы к эталону wt. Все данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение.

ФИГ. 9А - ФИГ. 9D иллюстрируют, что потеря активности вектора с течением времени коррелирует с прогрессирующим дезамидированием. (ФИГ. 9А) Получение вектора (устойчивые копии генома к ДНКзе I, GC) для временного анализа трижды трансфицированных клеток НЕК 293, продуцирующих вектор AAV8, в котором упакован репортерный ген люциферазы. Уровни GC нормализованы до максимального наблюдаемого значения. (ФИГ. 9В) Очищенный вектор, зависящий от времени, использовали для трансдукции клеток Huh7. Эффективность трансдукции (единицы люминесценции на GC, добавленные к клеткам-мишеням) измеряли, как на ФИГ. 8В с использованием нескольких разведений очищенных образцов вектора, зависящего от времени. Столбцы погрешностей представляют собой стандартное отклонение по меньшей мере 10 технических повторов для каждой выборки. Дезамидирование сайтов NG AAV8 (ФИГ. 9С) и сайтов, не являющихся NG, (ФИГ. 9D) для вектора, собранного через 1, 2 и 5 дней после трансфекции.

ФИГ. 10А - ФИГ. 10D иллюстрирует влияние стабилизации аспарагина на характеристики вектора. ФИГ. 10А демонстрирует титры wtAAV8 и мутантных векторов в позиции +1, полученных в результате мелкомасштабной тройной трансфекции в клетках 293, как измерено с помощью количественной ПЦР (кПЦР). Титры указаны относительно контроля wtAAV8. ФИГ. 10В демонстрирует эффективность трансдукции мутантных векторов AAV8, продуцирующих люциферазу светлячка, представленную по сравнению с контролем wtAAV8. Эффективность трансдукции измеряли, как на ФИГ. 8В с использованием неочищенного векторного материала. Для определения значимости между wtAAV8 и мутантной эффективностью трансдукции для G264A/G515A и G264A/G541A был проведен двухвыборочный t-тест (\*  $p < 0,005$ ). ФИГ. 10С демонстрирует экспрессию люциферазы на 14 день периода исследования в области печени мышей C57BL/6, которым внутривенно вводили wtAAV8 или мутантные векторы

(n=от 3 до 5), измеренные с помощью визуализации люциферазы и представленные в единицах общего потока. ФИГ. 10D демонстрирует титры и эффективность трансдукции мультисайтовых мутантных векторов AAV8, продуцирующих люциферазу светлячка, по сравнению с контролем wtAAV8. Все данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение.

ФИГ. 11A - ФИГ. 11C. Анализ дезамидирования аспарагина и глутамина в капсидных белках AAV9. (ФИГ. 11A) 1e11 GC wtAAV9 анализировали с помощью 2D гель-электрофореза и окрашивали Sypro Ruby. Маркировка белков: А обозначает VP1; В обозначает VP2; С обозначает VP3, D обозначает маркер кональбумина куриного яичного белка, Е обозначает маркер турбонуклеазы. Изоэлектрическая фокусировка выполнялась в диапазоне pI 6-10. (ФИГ. 11B) Процент дезамидирования по конкретным представляющим интерес остаткам аспарагина и глутамина показан для триптических пептидов AAV9, очищенных различными способами. Столбцы, указывающие на дезамидирование остатков аспарагина с помощью N+1 глицинов, заштрихованы. Были включены остатки, которые, как было установлено, являются дезамидированными по меньшей мере на 2% в по меньшей мере одном проанализированном препарате. Данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение. (ФИГ. 11C) Изоаспарагиновая модель N512 показана на карте электронной плотности 2FoFc, полученной в результате объективного уточнения кристаллической структуры AAV9 (PDB ID: 3UX1). Стрелка указывает электронную плотность, соответствующую группе R остатка N512.

ФИГ. 11D - ФИГ. 11F. Определение факторов, влияющих на дезамидирование капсида AAV9. (ФИГ. 11D) Два препарата AAV9 инкубировали при 70°C в течение трех или семи дней или (ФИГ. 11F) подвергали воздействию pH 2 или pH 10 в течение семи дней для определения возможных источников дезамидирования, не свойственных образованию капсида AAV. Данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение. (ФИГ. 11F) Дот-блот вектора, обработанного как на ФИГ. 11D с использованием антитела B1 (реагирующего на денатурированный капсид) для оценки структурной целостности капсида.

ФИГ. 11G и ФИГ. 11H иллюстрируют анализ *in vitro* влияния генетического дезамидирования на характеристики вектора для AAV9. (ФИГ. 11G) Титры wtAAV9 и мутантных векторов с генетическим дезамидированием получали с помощью мелкомасштабной тройной трансфекции в клетках 293, по данным количественной ПЦР (кПЦР). Титры указаны относительно контроля wtAAV9. Сайты NG с высоким уровнем дезамидирования (столбцы с паттерном), сайты с низким уровнем дезамидирования (белые столбцы) и сайты с высокой вариабельностью (черные столбцы) представлены с wtAAV8 и отрицательным контролем. (ФИГ. 11H) Эффективность трансдукции мутантных векторов AAV9, продуцирующих люциферазу светлячка, представлена по сравнению с контролем wtAAV9. Все данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение.

ФИГ. 11I - ФИГ. 11K демонстрируют *in vitro* активность вектора AAV9 во времени. (ФИГ. 11I) Получение вектора (устойчивые копии генома к ДНКзе I, GC) для временного анализа трижды трансфицированных клеток НЕК 293, продуцирующих вектор AAV9, в котором упакован репортерный ген люциферазы. Уровни GC нормализованы до максимального наблюдаемого значения. (ФИГ. 11J) Неочищенный вектор, зависимый от времени, использовали для трансдукции клеток Huh7. (ФИГ. 11K) Эффективность трансдукции вектора, собранного через 1 день после трансфекции, по сравнению с 5 днями после трансфекции показана для неочищенных и очищенных векторных образцов. Эффективность трансдукции выражается как активность люциферазы/GC, нормализованная по значению на 1 день.

На ФИГ. 12A представлено выравнивание аминокислотных последовательностей AAV5.5.9 [SEQ ID NO: 10] (также иногда называемый AAVG5), AAV9 [SEQ ID NO: 4] и AAVPHP.B [SEQ ID NO: 12], подготовленное с использованием Clustal Omega 1.2.2 и его параметров по умолчанию для выравнивания. На ФИГ. 12B - 12E представлено выравнивание последовательностей нуклеотидов AAV5.5.9 [SEQ ID NO: 9], PHP.B [SEQ ID NO: 11], AAV9 [SEQ ID NO: 3] и AAVhu68 [SEQ ID NO: 14].

На ФИГ. 13A представлено выравнивание аминокислотных последовательностей тройного мутанта AAV8 (AAV8T)[SEQ ID NO: 16], AAV8.AR2.08 [SEQ ID NO: 18] (также иногда называемый AAVG3, или AR2, или AAV.AR2) и AAV8

[SEQ ID NO: 20], подготовленное с использованием Clustal Omega 1.2.2 и его параметров по умолчанию для выравнивания. На ФИГ. 13B - 13D представлено выравнивание последовательностей нуклеотидов тройного мутанта AAV8 [SEQ ID NO: 15], AAV8.AR2.08 [SEQ ID NO: 17], AAV8 [SEQ ID NO: 19].

На ФИГ. 14A представлено выравнивание аминокислотных последовательностей AAVrh79 [SEQ ID NO: 2] (также иногда называемый AAVG2), AAVrh10 [SEQ ID NO: 24] и AAVhu37 [SEQ ID NO: 22], с использованием Clustal Omega 1.2.2 и его параметров по умолчанию для выравнивания. На ФИГ. 14B - 14D представлено выравнивание последовательностей нуклеотидов AAVrh79 [SEQ ID NO: 1], AAVrh10 [SEQ ID NO: 22] и AAVhu37 [SEQ ID NO: 21].

Фиг.15A и 15B иллюстрируют выход получения для AAV8triple, AAVhu68, AAV9, AAV9 и AAVrh79 в мелкомасштабных или крупномасштабных препаратах указанного вектора.

На ФИГ. 16 представлена чистота получения крупномасштабных препаратов на ФИГ. 15B.

На ФИГ. 17A-17D показана экспрессия люциферазы в печени и мышечной ткани после внутримышечного (IM) введения  $3 \times 10^{11}$  GC/мышь в икроножную мышцу самцов мышей C57BL/6 (n=5/группа) с использованием векторов, экспрессирующих люциферазу светлячков.

ФИГ. 18A демонстрирует плазмиду, использованную для экспериментов с баркодом в Примере 5. ФИГ. 18B демонстрирует количества каждого варианта баркода

AAV, введенного 6 черным мышам. Животных умерщвляли, собирали образцы тканей и выделяли ДНК из каждого из них. Общее распределение векторов для трех животных показано на ФИГ. 18С. Фактическая и теоретическая частота вводимого векторного микса показана на ФИГ. 18D.

На ФИГ. 19А-ФИГ. 20С показаны результаты экспериментов по биораспределению баркода из Примера 5. Отдельные образцы тканей анализировали на частоту отдельного баркода в образце по сравнению с инъекционной смесью для геномной и кДНК. Результаты показаны для мышц (ФИГ. 19А, 19В); сердца (ФИГ. 19С и ФИГ. 19D) и печени (ФИГ. 19Е и ФИГ. 19F). Изменения кратности по сравнению с теоретическими частотами показаны на ФИГ. 20А - ФИГ. 20С.

На ФИГ. 21 и 22 показано биораспределение AAV8.AR2.08 у мышей по сравнению с AAV8. Результаты показывают, что AAV8.AR2.08 более специфичен для печени, чем AAV8.

ФИГ. 23 сравнивает AAV8 против AAV8.AR2.08 против AAVrh79 в отношении титра и выхода, связанных с технологичностью.

ФИГ. 24 демонстрирует биораспределение AAV8.AR2.08 в тканях (крайний левый столбец) по сравнению с AAV8 (средний и правый столбцы).

На ФИГ. 25-28 показаны результаты после введения векторов AAV приматам, не являющихся человеком. ФИГ. 25 содержит подробную информацию о векторах и животных, использованных для исследований. ФИГ. 26 количественно определяет уровни GC и GFP, обнаруженные в печени животных, получивших векторы AAV8, AAVrh79 или AAV8.AR2.08. ФИГ. 27 суммирует уровни экспрессии GFP в печени HNP. ФИГ. 28 демонстрирует уровень вектора, обнаруженный в ткани от HNP, которым вводили векторы AAV8, AAVrh79 или AAV8.AR2.08.

ФИГ. 29 демонстрирует биораспределение вектора AAVrh79, обнаруженное в различных тканях.

## ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В данном документе предложен рекомбинантный аденоассоциированный вирус (гAAV), имеющий гетерогенность последовательности и заряда в каждой из трех популяций капсидных белков VP1, VP2 и VP3, находящихся внутри капсида рекомбинантного AAV, и композиции, содержащие их. В данном документе предложены новые гAAV, а также способы уменьшения дезамидирования и, необязательно, другие модификации мономера капсида. Кроме того, в данном документе предложены модифицированные гAAV с уменьшенными модификациями, которые полезны для получения гAAV, имеющего капсиды, которые сохраняют большую стабильность, эффективность и/или чистоту.

«Рекомбинантный AAV» или «гAAV» представляет собой устойчивую к ДНКазе вирусную частицу, содержащую два элемента, капсид AAV и векторный геном, содержащий по меньшей мере последовательности, не кодирующие AAV, упакованные в капсид AAV. Если не указано иное, этот термин может использоваться взаимозаменяемо с

фразой «вектор гAAV». гAAV является «вирусом с дефектом репликации» или «вирусным вектором», так как он лишен какого-либо функционального гена повтора AAV или функционального гена кэпа AAV и не может генерировать потомство. В некоторых вариантах воплощения единственными последовательностями AAV являются последовательности инвертированных концевых повторов (ITR) AAV, обычно расположенные на самых 5'- и 3'-концах векторного генома, чтобы позволить упаковывать генные и регуляторные последовательности, расположенные между ITR внутри капсида AAV.

В контексте данного документа, термин «векторный геном» относится к последовательности нуклеиновой кислоты, упакованной внутри капсида гAAV, который образует вирусную частицу. Такая последовательность нуклеиновой кислоты содержит последовательности инвертированных концевых повторов (ITR) AAV. В приведенных в данном документе примерах векторный геном содержит, как минимум, от 5' до 3', AAV 5' ITR, кодирующую(ие) последовательность(и) и AAV 3' ITR. Могут быть выбраны ITR из AAV2, AAV другого источника, чем капсид, или ITR, отличные от полноразмерных. В некоторых вариантах воплощения ITR происходят из того же источника AAV, что и AAV, который обеспечивает функцию воспроизведения во время продуцирования или транскомплементации AAV. Дополнительно, могут использоваться другие ITR. Дополнительно, векторный геном содержит регуляторные последовательности, которые направляют экспрессию продуктов гена. Подходящие компоненты векторного генома обсуждаются в данном документе более подробно.

гAAV состоит из капсида AAV и векторного генома. Капсид AAV представляет собой совокупность гетерогенной популяции vp1, гетерогенной популяции vp2 и гетерогенной популяции vp3 белков. Термин «гетерогенный» или любые его грамматические вариации, используемые для обозначения капсидных белков vp, в контексте данного документа, относится к популяции, состоящей из элементов, которые не являются одинаковыми, например, имеющей мономеры (белки) vp1, vp2 или vp3 с различными модифицированными аминокислотными последовательностями.

В контексте данного документа, термин «гетерогенная популяция», используемый по отношению к белкам vp1, vp2 и vp3 (альтернативно называемым изоформами), относится к различиям в аминокислотной последовательности белков vp1, vp2 и vp3 в пределах капсида. Капсид AAV содержит субпопуляции белков vp1, белков vp2 и белков vp3, которые имеют модификации по сравнению с предсказанными аминокислотными остатками. Эти субпопуляции включают, как минимум, определенные остатки дезамидированного аспарагина (N или Asn). Например, определенные субпопуляции содержат по меньшей мере одну, две, три или четыре позиции сильно дезамидированного аспарагина (N) в парах аспарагин-глицин и, необязательно, дополнительно содержат другие дезамидированные аминокислоты, при этом дезамидирование приводит к замене аминокислоты и другим необязательным модификациям.

В контексте данного документа, «субпопуляция» белков vp относится к группе

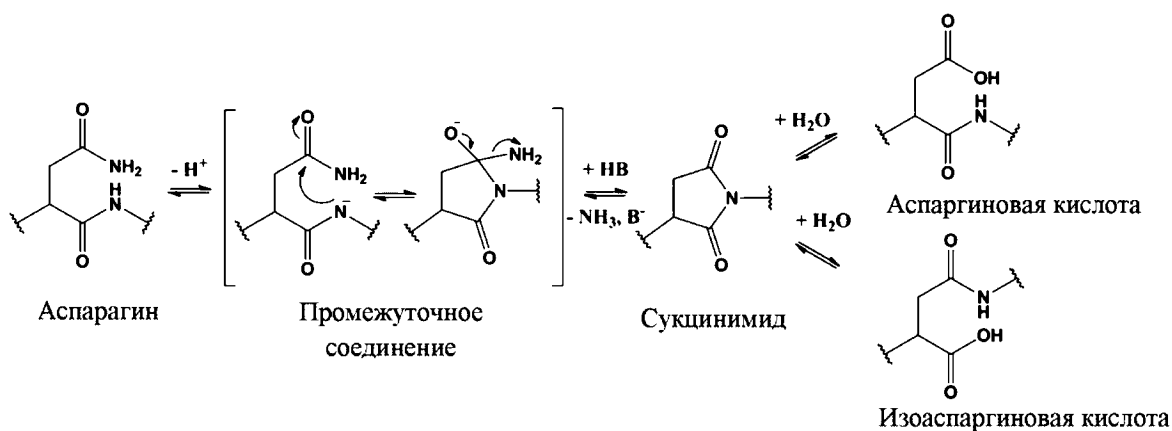
белков  $\nu p$ , которая имеет по меньшей мере одну определенную общую характеристику и которая состоит из по меньшей мере от одного члена группы до менее, чем всех членов контрольной группы, если не указано иное. Например, «субпопуляция» белков  $\nu p1$  может быть по меньшей мере одним (1) белком  $\nu p1$  и меньше, чем все белки  $\nu p1$  в собранном капсиде AAV, если не указано иное. «Субпопуляция» белков  $\nu p3$  может состоять из количества белков от одного (1) белка  $\nu p3$  до меньше, чем все белки  $\nu p3$  в собранном капсиде AAV, если не указано иное. Например, белки  $\nu p1$  могут быть субпопуляцией белков  $\nu p$ ; белки  $\nu p2$  могут быть отдельной субпопуляцией белков  $\nu p$ , а  $\nu p3$  представляют собой еще одну субпопуляцию белков  $\nu p$  в собранном капсиде AAV. В другом примере белки  $\nu p1$ ,  $\nu p2$  и  $\nu p3$  могут содержать субпопуляции, имеющие различные модификации, например, по меньшей мере, один, два, три или четыре сильно дезамидированных аспарагина, например, по парам аспарагин-глицин.

Если не указано иное, под сильно дезамидированным понимается по меньшей мере 45% дезамидированного, по меньшей мере 50% дезамидированного, по меньшей мере 60% дезамидированного, по меньшей мере 65% дезамидированного, по меньшей мере 70%, по меньшей 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 до приблизительно 100% дезамидированного в указанной позиции аминокислоты по сравнению с предсказанной аминокислотной последовательностью в указанной позиции аминокислоты (например, по меньшей мере 80% аспарагинов в аминокислоте 57 SEQ ID NO:2 может быть дезамидировано на основе общих белков  $\nu p1$ , может быть дезамидировано на основе общих белков  $\nu p1$ ,  $\nu p2$  и  $\nu p3$ ). Такие проценты могут быть определены с использованием методов 2D-геля, масс-спектрометрии или других подходящих методов.

Без привлечения теории отметим, что дезамидирование, по меньшей мере, сильно дезамидированных остатков в белках  $\nu p$  в капсиде AAV является в основном неферментативным по своей природе, поскольку оно вызвано функциональными группами в белке капсида, которые дезамидируют выбранные аспарагины, и в меньшей степени - остатки глутамин. Эффективная сборка капсида большинства белков дезамидирования  $\nu p1$  указывает на то, что либо эти события происходят после сборки капсида, либо что дезамидирование в отдельных мономерах ( $\nu p1$ ,  $\nu p2$  или  $\nu p3$ ) хорошо переносится структурно и в значительной степени не влияет на динамику сборки. Обширное дезамидирование в VP1-уникальной (VP1-u) области (~ aa 1-137), которая обычно считается локализованной внутри до проникновения в клетку, предполагает, что дезамидирование VP может происходить до сборки капсида.

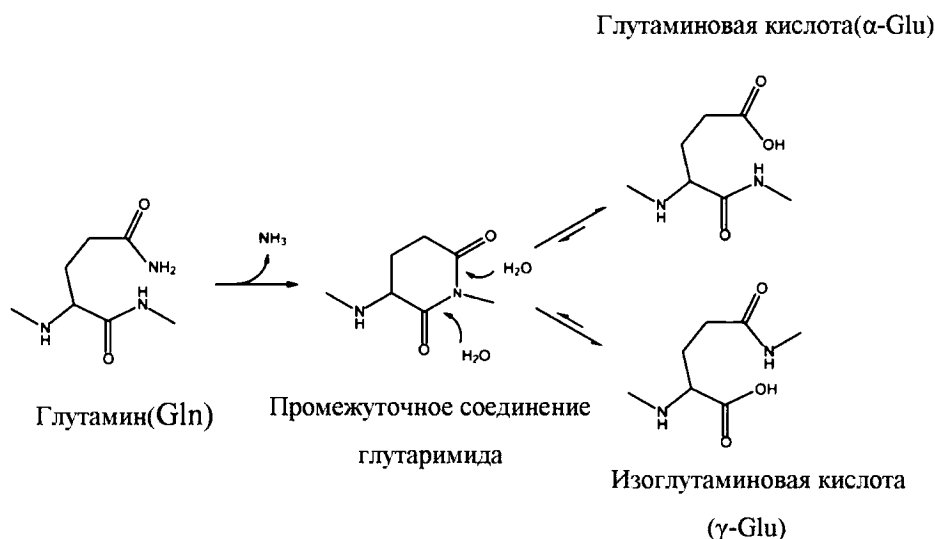
Без привлечения теории отметим, что дезамидирование N может происходить через атом азота остова C-концевого остатка, который проводит нуклеофильную атаку на атом углерода амидной группы боковой цепи Asn. Полагают, что образуется промежуточный сукцинимидный остаток с замкнутым кольцом. Остаток сукцинимиды затем проводит быстрый гидролиз с образованием конечного продукта - аспарагиновой

кислоты (Asp) или изоаспарагиновой кислоты (IsoAsp). Следовательно, в некоторых вариантах воплощения дезамидирование аспарагина (N или Asn) приводит к Asp или IsoAsp, которые могут взаимно превращаться через промежуточное соединение сукцинимид, например, как показано ниже.



Как предложено в данном документе, каждый дезамидированный N в VP1, VP2 или VP3 может независимо представлять собой аспарагиновую кислоту (Asp), изоаспарагиновую кислоту (isoAsp), аспартат и/или взаимопревращающуюся смесь Asp и isoAsp или их комбинации. Может присутствовать любое подходящее соотношение  $\alpha$ - и изоаспарагиновой кислоты. Например, в некоторых вариантах воплощения соотношение может составлять от 10:1 до 1:10 аспарагиновая кислота:изоаспарагиновая, приблизительно 50:50 аспарагиновая:изоаспарагиновая, или приблизительно 1:3 аспарагиновая:изоаспарагиновая, или другое выбранное соотношение.

В некоторых вариантах воплощения один или более глутаминов (Q) могут быть дезамидированы до глутаминовой кислоты (Glu), то есть  $\alpha$ -глутаминовой кислоты,  $\gamma$ -глутаминовой кислоты (Glu) или смеси  $\alpha$ - и  $\gamma$ -глутаминовой кислоты, которая может преобразовываться через обычный промежуточный глутаринимид. Может присутствовать любое подходящее соотношение  $\alpha$ - и  $\gamma$ -глутаминовой кислоты. Например, в некоторых вариантах воплощения соотношение может составлять от 10:1 до 1:10  $\alpha$  к  $\gamma$ , приблизительно 50:50  $\alpha$ : $\gamma$  или приблизительно 1:3  $\alpha$ : $\gamma$ , или другое выбранное соотношение.



Таким образом, гAAV включает субпопуляции внутри капсида гAAV белков vp1, vp2 и/или vp3 с дезамидированными аминокислотами, включая как минимум, по меньшей мере, одну субпопуляцию, содержащую, по меньшей мере, один сильно дезамидированный аспарагин. Кроме того, другие модификации могут включать изомеризацию, в частности, по выбранным позициям остатков аспарагиновой кислоты (D или Asp). В других вариантах воплощения модификации могут включать амидирование в позиции Asp.

В некоторых вариантах воплощения капсид AAV содержит субпопуляции vp1, vp2 и vp3, имеющие от по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5 до по меньшей мере приблизительно 25 позиций остатков дезамидированных аминокислот, из которых по меньшей мере от 1 до 10%, по меньшей мере от 10 до 25%, по меньшей мере от 25 до 50%, по меньшей мере от 50 до 70%, по меньшей мере от 70 до 100%, по меньшей мере от 75 до 100%, по меньшей мере от 80 до 100% или по меньшей мере от 90 до 100% дезамидированы по сравнению с кодируемой аминокислотной последовательностью белков vp. Большинство из них могут быть N остатками. Однако остатки Q также могут быть дезамидированы.

В контексте данного документа, термин «кодируемая аминокислотная последовательность» относится к аминокислоте, которая предсказывается на основании трансляции известного кодона ДНК указанной последовательности нуклеиновой кислоты, транслируемой в аминокислоту. В следующей таблице показаны кодоны ДНК и двадцать общих аминокислот, демонстрирующие как однобуквенный код (SLC), так и трехбуквенный код (3LC).

| Аминокислота | SLC | 3 LC | ДНК кодоны                   |
|--------------|-----|------|------------------------------|
| Изолейцин    | I   | Ile  | ATT, ATC, ATA                |
| Лейцин       | L   | Leu  | CTT, CTC, CTA, CTG, TTA, TTG |
| Валин        | V   | Val  | GTT, GTC, GTA, GTG           |

|                       |      |     |                              |
|-----------------------|------|-----|------------------------------|
| Фенилаланин           | F    | Phe | TTT, TTC                     |
| Метионин              | M    | Met | ATG                          |
| Цистеин               | C    | Cys | TGT, TGC                     |
| Аланин                | A    | Ala | GCT, GCC, GCA, GCG           |
| Глицин                | G    | Gly | GGT, GGC, GGA, GGG           |
| Пролин                | P    | Pro | CCT, CCC, CCA, CCG           |
| Треонин               | T    | Thr | ACT, ACC, ACA, ACG           |
| Серин                 | S    | Ser | TCT, TCC, TCA, TCG, AGT, AGC |
| Тирозин               | Y    | Tyr | TAT, TAC                     |
| Триптофан             | W    | Trp | TGG                          |
| Глутамин              | Q    | Gln | CAA, CAG                     |
| Аспарагин             | N    | Asn | AAT, AAC                     |
| Гистидин              | H    | His | CAT, CAC                     |
| Глутаминовая кислота  | E    | Glu | GAA, GAG                     |
| Аспарагиновая кислота | D    | Asp | GAT, GAC                     |
| Лизин                 | K    | Lys | AAA, AAG                     |
| Аргинин               | R    | Arg | CGT, CGC, CGA, CGG, AGA, AGG |
| Стоп кодоны           | Стоп |     | TAA, TAG, TGA                |

В некоторых вариантах воплощения гAAV имеет капсид AAV, содержащий белки vp1, vp2 и vp3, имеющие субпопуляции, содержащие комбинации из двух, трех, четырех или более дезамидированных остатков в позициях, указанных в таблицах, представленных в настоящем документе и включенных в настоящий документ посредством ссылки.

Дезамидирование в гAAV может быть определено с использованием 2D геле-электрофореза, и/или масс-спектрометрии, и/или методов моделирования белков. Онлайн-хроматография может быть выполнена с использованием колонки Acclaim PepMap и системы Thermo UltiMate 3000 RSLC (Thermo Fisher Scientific), соединенной с Q Exactive HF с источником NanoFlex (Thermo Fisher Scientific). Данные МС получают с использованием зависящего от данных способа топ-20 для Q Exactive HF, динамически выбирая наиболее распространенные еще не секвенированные ионы-предшественники из обзорных сканирований (200-2000 м/з). Секвенирование выполняется посредством фрагментации столкновительной диссоциации с более высокой энергией с целевым значением ионов  $1e5$ , определенным с помощью прогнозирующего автоматического управления усилением, а выделение предшественников выполнялось с окном 4 м/з. Обзорные изображения были получены с разрешением 120 000 при м/з 200. Разрешение

для спектров HCD может быть установлено на 30000 при  $m/z$  200 с максимальным временем ввода ионов 50 мс и нормализованной энергией столкновения 30. Уровень RF S-линзы может быть установлен на 50, чтобы обеспечить оптимальную трансмиссию  $m/z$  области, занятой пептидами из гидролизата. Ионы-предшественники могут быть исключены из выбора фрагментации с одиночным, неназначенным или шестью и более высокими состояниями заряда. Для анализа полученных данных может использоваться программное обеспечение BioPharma Finder 1.0 (Thermo Fischer Scientific). Для картирования пептидов поиск выполняется с использованием базы данных FASTA с однократной записью белков с карбамидометилированием, заданным как фиксированная модификация; и окислением, дезамидированием и фосфорилированием, заданным как переменные модификации, точность определения массы 10 ppm, высокая протеазная специфичность и уровень достоверности 0,8 для спектров MS/MS. Примеры подходящих протеаз могут включать, например, трипсин или химотрипсин. Масс-спектрометрическая идентификация дезамидированных пептидов относительно проста, так как дезамидирование добавляет к массе интактной молекулы +0,984 Да (разница масс между группами -ОН и -NH<sub>2</sub>). Процент дезамидирования конкретного пептида определяется массовой площадью дезамидированного пептида, деленной на сумму площадей дезамидированного и нативного пептидов. Учитывая количество возможных сайтов дезамидирования, изобарные частицы, которые дезамидированы в разных сайтах, могут совместно мигрировать в одном пике. Следовательно, фрагментные ионы, происходящие из пептидов с множественными потенциальными сайтами дезамидирования, можно использовать для определения местоположения или дифференциации множества сайтов дезамидирования. В этих случаях относительные интенсивности в пределах наблюдаемых изотопных паттернов можно использовать для конкретного определения относительного содержания различных изомеров дезамидированного пептида. Этот способ предполагает, что эффективность фрагментации для всех изомерных частиц одинакова и не зависит от места дезамидирования. Специалисту в данной области техники будет понятно, что можно использовать ряд вариаций этих иллюстративных способов. Например, подходящие масс-спектрометры могут включать, например, квадрупольный времяпролетный масс-спектрометр (QTOF), такой как Waters Xevo или Agilent 6530, или прибор для орбитальной ловушки, такой как Orbitrap Fusion или Orbitrap Velos (Thermo Fisher). Подходящие системы жидкостной хроматографии включают, например, систему Acquity UPLC от Waters или Agilent systems (серии 1100 или 1200). Подходящее программное обеспечение для анализа данных может включать, например, MassLynx (Waters), Pinpoint и Pepfinder (Thermo Fischer Scientific), Mascot (Matrix Science), Peaks DB (Bioinformatics Solutions). Другие методы могут быть описаны, например, в X. Jin et al, *Hu Gene Therapy Methods*, Vol. 28, No. 5, pp. 255-267, опубликовано в Интернете 16 июня 2017 г.

Помимо дезамидирования, могут происходить другие модификации, не приводящие к превращению одной аминокислоты в другой аминокислотный остаток.

Такие модификации могут включать ацетилированные остатки, изомеризацию, фосфорилирование или окисление.

**Модуляция Дезамидирования.** В некоторых вариантах воплощения AAV модифицируют для изменения глицина в паре аспарагин-глицин для уменьшения дезамидирования. В других вариантах воплощения аспарагин заменен на другую аминокислоту, например, глутамин, который дезамидируется с более медленной скоростью; или на аминокислоту, у которой отсутствуют амидные группы (например, глутамин и аспарагин содержат амидные группы); и/или на аминокислоту, у которой отсутствуют аминокислотные группы (например, лизин, аргинин и гистидин содержат аминокислотные группы). В контексте данного документа, аминокислоты, не содержащие боковых амидных или аминокислотных групп, относятся, например, к глицину, аланину, валину, лейцину, изолейцину, серину, треонину, цистину, фенилаланину, тирозину или триптофану и/или пролину. Модификации, такие как описаны, могут быть в одной, двух или трех парах аспарагин-глицин, обнаруженных в кодируемой аминокислотной последовательности AAV. В некоторых вариантах воплощения такие модификации не производятся во всех четырех парах аспарагин-глицин. Таким образом, это способ уменьшения дезамидирования AAV и/или сконструированных вариантов AAV, имеющих более низкие скорости дезамидирования. Дополнительно или альтернативно одна или более других амидных аминокислот могут быть заменены на неамидную аминокислоту для уменьшения дезамидирования AAV. В некоторых вариантах воплощения описанный в данном документе мутантный капсид AAV содержит мутацию в паре аспарагин-глицин, так что глицин заменяется на аланин или серин. Мутантный капсид AAV может содержать один, два или три мутанта, где исходный AAV изначально содержит четыре пары NG. В некоторых вариантах воплощения капсид AAV может содержать один, два, три или четыре таких мутанта, где исходный AAV изначально содержит пять пар NG. В некоторых вариантах воплощения мутантный капсид AAV содержит только одну мутацию в паре NG. В некоторых вариантах воплощения мутантный капсид AAV содержит мутации в двух разных парах NG. В некоторых вариантах воплощения мутантный капсид AAV содержит мутацию двух разных пар NG, которые расположены в структурно разных местах капсида AAV. В некоторых вариантах воплощения мутация находится не в уникальной области VP1. В некоторых вариантах воплощения одна из мутаций находится в уникальной области VP1. Необязательно, мутантный капсид AAV не содержит модификаций в парах NG, но содержит мутации для минимизации или устранения дезамидирования в одном или более аспарагинах или глутамине, находящихся вне пары NG.

В некоторых вариантах воплощения предложен способ повышения эффективности вектора gAAV, который включает конструирование капсида AAV, который устраняет один или более NG в капсиде AAV дикого типа. В некоторых вариантах воплощения кодирующая последовательность для «G» в «NG» сконструирована для кодирования другой аминокислоты. В некоторых нижеприведенных примерах используется буква «S»

или «А». Однако могут быть выбраны другие подходящие аминокислотные кодирующие последовательности. См., например, таблицы ниже, в которых на основе нумерации AAV8 кодирующая последовательность модифицирована по меньшей мере для одной из следующих позиций: N57+1, N263+1, N385+1, N514+1, N540+1, или как показано в таблицах ниже. В некоторых вариантах воплощения мутанты AAV8 избегают изменения пар NG в позициях N57, N94, N263, N305, Q467, N479 и/или N653. В некоторых вариантах воплощения другие AAV избегают мутации в соответствующих позициях N, как определено на основании выравнивания с AAV8, с использованием нумерации AAV8 в качестве ссылки.

Эти аминокислотные модификации могут быть выполнены обычными методами генной инженерии. Например, может быть создана последовательность нуклеиновой кислоты, содержащая модифицированные кодоны *yr* AAV, в которой от одного до трех кодонов, кодирующих глицин в парах аргинин-глицин, модифицированы для кодирования аминокислоты, отличной от глицина. В некоторых вариантах воплощения последовательность нуклеиновой кислоты, содержащая модифицированные кодоны аргинина, может быть сконструирована в одной-трех парах аргинин-глицин, так что модифицированный кодон кодирует аминокислоту, отличную от аргинина. Каждый модифицированный кодон может кодировать другую аминокислоту. Альтернативно, один или более измененных кодонов могут кодировать одну и ту же аминокислоту. В некоторых вариантах воплощения эти модифицированные последовательности нуклеиновой кислоты AAVrh79, AAV8.AR2.08 или AAV5.5.9 можно использовать для создания мутантного rAAV, имеющего капсид с более низким дезамидированием, чем нативный капсид AAVrh79, AAV8.AR2.08 или AAV5.5.9. Такой мутантный rAAV может иметь сниженную иммуногенность и/или повышенную стабильность при хранении, особенно при хранении в форме суспензии.

В данном документе также предложены последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие капсиды AAV, имеющие сниженное дезамидирование. Специалист в данной области техники может разработать последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие этот капсид AAV, включая ДНК (геномную или кДНК) или РНК (например, мРНК). Такие последовательности нуклеиновых кислот могут быть оптимизированы по кодонам для экспрессии в выбранной системе (т.е. типе клетки), могут быть сконструированы различными способами. Эта оптимизация может выполняться с использованием способов, доступных в Интернете (например, GeneArt), опубликованных способов или компании, которая предоставляет услуги по оптимизации кодонов, например, DNA2.0 (Menlo Park, CA). Один способ оптимизации кодонов описан, например, в публикации международного патента № WO 2015/012924, которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки. См. также, например, публикацию патента США № 2014/0032186 и публикацию патента США № 2006/0136184. Соответственно, изменяется вся длина открытой рамки считывания (ORF) для продукта. Однако в некоторых вариантах воплощения может быть изменен только фрагмент ORF.

Используя один из этих способов, можно применить частоты к любой заданной полипептидной последовательности и получить фрагмент нуклеиновой кислоты кодирующей области с оптимизированным кодоном, которая кодирует полипептид. Доступен ряд вариантов для выполнения фактических изменений кодонов или для синтеза кодирующих областей с оптимизированным кодоном, разработанных, как описано в данном документе. Такие модификации или синтез могут быть выполнены с использованием стандартных и рутинных молекулярно-биологических манипуляций, хорошо известных специалистам в данной области техники. В одном подходе серию комплементарных олигонуклеотидных пар, каждая из 80-90 нуклеотидов по длине, и охватывающих длину желаемой последовательности синтезируют стандартными способами. Эти пары олигонуклеотидов синтезируются таким образом, что при отжиге они образуют двухцепочечные фрагменты из 80-90 пар оснований, содержащие липкие концы, например, каждый олигонуклеотид в паре синтезируется с удлинением на 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более оснований за пределами области, комплементарной другому олигонуклеотиду в паре. Одноцепочечные концы каждой пары олигонуклеотидов предназначены для отжига с одноцепочечным концом другой пары олигонуклеотидов. Пары олигонуклеотидов подвергаются отжигу, а затем приблизительно от пяти до шести из этих двухцепочечных фрагментов отжигаются вместе через липкие одноцепочечные концы, затем они лигируются вместе и клонируются в стандартный бактериальный вектор клонирования, например, Вектор TOPO®, доступный от Invitrogen Corporation, Карлсбад, Калифорния. Затем конструкцию секвенируют стандартными способами. Подготавливают несколько из этих конструкций, состоящих из 5-6 фрагментов из 80-90 пар оснований, сшитых вместе, т.е. фрагменты приблизительно из 500 пар оснований, так что вся желаемая последовательность представлена в серии плазмидных конструкций. Затем вставки этих плазмид разрезают соответствующими рестрикционными ферментами и лигируют вместе с образованием конечной конструкции. Затем конечную конструкцию клонируют в стандартный бактериальный вектор клонирования и секвенируют. Дополнительные способы будут немедленно очевидны для квалифицированного специалиста. Кроме того, синтез генов легко доступен на рынке.

В некоторых вариантах воплощения предложены капсиды AAV, которые имеют гетерогенную популяцию изоформ капсида AAV (то есть VP1, VP2, VP3), которые содержат несколько сильно дезамидированных позиций «NG». В некоторых вариантах воплощения сильно дезамидированные позиции находятся в позициях, указанных ниже, со ссылкой на predetermined полноразмерную аминокислотную последовательность VP1. В других вариантах воплощения ген капсида модифицируется так, что указанный «NG» удаляется, а мутантный «NG» конструируется в другой позиции.

В некоторых вариантах воплощения смешанная популяция rAAV получается из продуцирующей системы с использованием одной последовательности нуклеиновой кислоты капсида AAV, кодирующей predetermined аминокислотную последовательность VP1 AAV одного типа AAV. Однако процесс продукции и

производства предусматривает описанную выше гетерогенную популяцию капсидных белков.

В некоторых вариантах воплощения предложен новый изолированный капсид AAVrh79. Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая AAV, предложена в SEQ ID NO:1, а кодируемая аминокислотная последовательность предложена в SEQ ID NO:2.

В некоторых вариантах воплощения rAAV содержит капсид AAVrh79. Капсид AAVrh79 включает гетерогенную популяцию белков vp1 AAVrh79, белков vp2 AAVrh79 и белков vp3 AAVrh79. В одном из вариантов воплощения капсид AAVrh79 получают путем экспрессии последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует предопределенную аминокислотную последовательность от 1 до 738 из SEQ ID NO:2. Необязательно, последовательности коэкспрессируют белок vp3 из последовательности нуклеиновой кислоты, за исключением уникальной области vp1 (приблизительноприблизительноприблизительно от 1 до 137 аминокислот) или уникальной области vp2 (приблизительноприблизительноприблизительно от 1 до 203 аминокислот), белки vp1, полученные из SEQ ID NO:1, или белки vp1, полученные из последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 70% идентичной SEQ ID NO:1, которая кодирует предопределенную аминокислотную последовательность от 1 до 738 из SEQ ID NO:2. В других вариантах воплощения, белки vp2 AAVrh79, полученные путем экспрессии из последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует предопределенную аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно из аминокислот 138-738 из SEQ ID NO:2, белки vp2, полученные из последовательности, содержащей, по меньшей мере, нуклеотиды от 412 до 2214 SEQ ID NO:1, или белки vp2, полученные из последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 70% идентичной по меньшей мере нуклеотидам от 412 до 2214 SEQ ID NO:1, которая кодирует предопределенную аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно из аминокислот от 138 до 738 из SEQ ID NO:2, белки vp3 AAVrh79, полученные путем экспрессии из последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует предопределенную аминокислотную последовательность по меньшей мере из приблизительно 204-738 аминокислот из SEQ ID NO:2, белки vp3, полученные из последовательности, содержащей по меньшей мере нуклеотиды с 610 по 2214 SEQ ID NO:1, или белки vp3, полученные из последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 70% идентичной по меньшей мере нуклеотидам от 610 до 2214 SEQ ID NO:1, которая кодирует предопределенную аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно из аминокислот от 204 до 738 из SEQ ID NO:2.

В некоторых вариантах воплощения капсид AAVrh79 содержит: гетерогенную популяцию белков vp1, которые являются продуктом последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, гетерогенную популяцию белков vp2, которые являются продуктом последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотную последовательность по меньшей мере

приблизительно из аминокислот 138-738 из SEQ ID NO: 2, и гетерогенную популяцию белков vp3, которые являются продуктом последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей по меньшей мере аминокислоты 204-738 из SEQ ID NO:2.

Белки vp1, vp2 и vp3 AAVrh79 содержат субпопуляции с аминокислотными модификациями, включающими по меньшей мере два сильно дезамидированных аспарагина (N) в парах аспарагин-глицин в SEQ ID NO: 2 и, необязательно, дополнительно включая субпопуляции, содержащие другие дезамидированные аминокислоты, где дезамидирование приводит к замене аминокислоты. Наблюдаются высокие уровни дезамидирования в парах N-G N57, N263, N385 и/или N514 относительно числа SEQ ID NO:2. Дезамидирование наблюдали в других остатках, как показано в таблице ниже и в примерах. В некоторых вариантах воплощения AAVrh79 может иметь другие дезамидированные остатки, например, обычно менее 10%, и/или может иметь другие модификации, включая метилирование (например, ~ R487) (обычно менее 5%, более типично менее 1% по данному остатку), изомеризацию (например, по D97) (обычно менее 5%, более типично менее 1% по данному остатку), фосфорилирование (например, если присутствует, в диапазоне от приблизительно 10 до приблизительно 60%, или от приблизительно 10 до приблизительно 30%, или от приблизительно 20 до приблизительно 60%) (например, по одному или более из S149, ~ S153, ~ S474, ~ T570, ~ S665) или окисление (например, по одному или более из W248, W307, W307, M405, M437, M473, W480, W480, W505, M526, M544, M561, W621, M637 и/или W697). Необязательно W может окисляться до кинуренина.

Таблица А - Дезамидирование AAVrh79

| Дезамидирование AAVrh79 на основе нумерации VP1 | % дезамидирования                                 |
|-------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| N57+Дезамидирование                             | 65-90, 70-95, 80-95, 75-100, 80-100<br>или 90-100 |
| N94+Дезамидирование                             | 5-15, приблизительно 10                           |
| ~N254+Дезамидирование                           | 10-20                                             |
| ~N263+Дезамидирование                           | 75-100                                            |
| ~N305+Дезамидирование                           | 1-5                                               |
| ~N385+Дезамидирование                           | 65-90, 70-95, 80-95, 75-100, 80-100<br>или 90-100 |
| ~N410+Дезамидирование                           | 1-25,                                             |
| N479+Дезамидирование                            | 1-5, 1-3                                          |
| ~N514+Дезамидирование                           | 65-90, 70-95, 80-95, 75-100, 80-100<br>или 90-100 |
| ~Q601+Дезамидирование                           | 0-1                                               |

|                                                 |                   |
|-------------------------------------------------|-------------------|
| Дезамидирование AAVrh79 на основе нумерации VP1 | % дезамидирования |
| N653+Дезамидирование                            | 0 -2              |

В некоторых вариантах воплощения капсид AAVrh79 модифицирован в одной или более позиций, указанных в предыдущей таблице, в диапазонах, предложенных ниже, что определено с помощью масс-спектрометрии с ферментом трипсином. В некоторых вариантах воплощения одна или более из следующих позиций или глицин, следующий за N, модифицирован, как описано в данном документе. Количество остатков основано на предложенной в данном документе последовательности AAVrh79. См., SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах воплощения последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая капсидный белок vp1 AAVrh79, предложена в SEQ ID NO: 1. В других вариантах воплощения последовательность нуклеиновой кислоты, от 70% до 99,9% идентичная SEQ ID NO: 1, может быть выбрана для экспрессии капсидных белков AAVrh79. В некоторых других вариантах воплощения последовательность нуклеиновой кислоты по меньшей мере на приблизительно 75% идентична, по меньшей мере на 80% идентична, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97% идентична или по меньшей мере на 99% - 99,9% идентична SEQ ID NO: 1. Однако другие последовательности нуклеиновых кислот, которые кодируют аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, могут быть выбраны для использования в получении капсидов гAAV. В некоторых вариантах воплощения последовательность нуклеиновой кислоты имеет последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1 или последовательность по меньшей мере на 70% - 99% идентичную, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную SEQ ID NO: 1, которая кодирует SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах воплощения последовательность нуклеиновой кислоты имеет последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1 или последовательность по меньшей мере от 70% до 99%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную от приблизительно нуклеотида 412 до приблизительно нуклеотида 2214 из SEQ ID NO: 1, которая кодирует капсидный белок vp2 (приблизительноприблизительноприблизительно 138-738 аминокислотных остатков) из SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах воплощения последовательность нуклеиновой кислоты имеет последовательность нуклеиновой кислоты от приблизительно нуклеотида 610 до приблизительно нуклеотида 2214 из SEQ ID NO:1 или последовательность, по меньшей мере на 70% - 99%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную SEQ ID NO: 1, которая кодирует капсидный белок vp3 (приблизительноприблизительноприблизительно 204-738

аминокислотных остатков) из SEQ ID NO: 2.

Изобретение также включает последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие мутантный AAVrh79, в котором один или более остатков были изменены для уменьшения дезамидирования или других модификаций, которые идентифицированы в данном документе. Такие последовательности нуклеиновых кислот можно использовать для получения мутантных капсидов rAAVrh79.

В некоторых вариантах воплощения предложен новый капсид AAV8.AR2.08. Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая AAV, предложена в SEQ ID NO:17, а кодируемая аминокислотная последовательность предложена в SEQ ID NO:18. В одном из вариантов воплощения рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) имеет капсид AAV8.AR2.08. Выравнивание аминокислотных последовательностей AAV8T, AAV8.AR2.08 и AAV8 представлено на ФИГ. 13A. Выравнивание последовательностей нуклеиновой кислоты AAV8T, AAV8.AR2.08 и AAV8 представлено на ФИГ. 13B-13D.

В некоторых вариантах воплощения капсид AAV8.AR2.08 содержит белки капсида AAV8.AR2.08, содержащие: белки vp1 AAV8.AR2.08, полученные путем экспрессии последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует предопределенную аминокислотную последовательность от 1 до 738 из SEQ ID NO: 18, белки vp1, полученные из SEQ ID NO:17, или белки vp1, полученные из последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 70% идентичной SEQ ID NO:17, которая кодирует предопределенную аминокислотную последовательность от 1 до 738 SEQ ID NO:18, белки vp2 AAV8.AR2.08, полученные путем экспрессии из последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует предопределенную аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно из аминокислот 138-738 из SEQ ID NO:18, белки vp2, полученные из последовательности, содержащей, по меньшей мере, нуклеотиды от 412 до 2214 SEQ ID NO:17, или белки vp2, полученные из последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 70% идентичной по меньшей мере нуклеотидам от 412 до 2214 SEQ ID NO:17, которая кодирует предопределенную аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно из аминокислот от 138 до 738 из SEQ ID NO:18, белки vp3 AAV8.AR2.08, полученные путем экспрессии из последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует предопределенную аминокислотную последовательность по меньшей мере из приблизительно 204-738 аминокислот из SEQ ID NO:18, белки vp3, полученные из последовательности, содержащей по меньшей мере нуклеотиды с 610 по 2214 SEQ ID NO:17, или белки vp3, полученные из последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 70% идентичной по меньшей мере нуклеотидам от 610 до 2214 SEQ ID NO:17, которая кодирует предопределенную аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно из аминокислот от 204 до 738 из SEQ ID NO:18.

Дополнительно или альтернативно капсид AAV8.AR2.08 содержит: гетерогенную популяцию белков vp1, которые являются продуктом последовательности нуклеиновой

кислоты, кодирующей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, гетерогенную популяцию белков vp2, которые являются продуктом последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно из аминокислот 138-738 из SEQ ID NO: 18, гетерогенную популяцию белков vp3, которые являются продуктом последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей по меньшей мере аминокислоты от 204 до 738 из SEQ ID NO: 18, где белки vp1, vp2 и vp3 содержат субпопуляции с аминокислотными модификациями, включающими по меньшей мере два сильно дезамидированных аспарагина (N) в парах аспарагин-глицин в SEQ ID NO: 18 и, необязательно, дополнительно включая субпопуляции, содержащие другие дезамидированные аминокислоты, где дезамидирование приводит к замене аминокислоты. AAV8.AR2.08 характеризуется наличием сильно дезамидированных остатков, например, в позициях N57, N263, N385, N514 и/или N540 на основе нумерации VP1 AAV8.AR2.08 [SEQ ID NO: 18]. Кроме того, остатки в позициях согласно следующей таблице и подробной таблице в приложении, демонстрируют дезамидирование, которое наблюдалось в капсиде AAV8.AR2.08.

В некоторых вариантах воплощения капсид AAV8.AR2.08 модифицирован в одном или более из следующих положений, в диапазонах, указанных ниже, как определено с помощью масс-спектрометрии с ферментом трипсином. В некоторых вариантах воплощения одна или более из следующих позиций или глицин, следующий за N, модифицирован, как описано в данном документе. Например, в некоторых вариантах воплощения G может быть модифицирован до S или A, например, в позиции 58, 264, 386, 515 или 541. Значительное снижение дезамидирования наблюдается, когда NG57/58 заменяется на NS 57/58 или NA57/58. Однако в некоторых вариантах воплощения наблюдается усиление дезамидирования, когда NG заменяется на NS или NA. В некоторых вариантах воплощения N пары NG модифицируется до Q при сохранении G. В определенных вариантах воплощения обе аминокислоты пары NG модифицированы. В некоторых вариантах воплощения N385Q приводит к значительному снижению дезамидирования в этом месте. В некоторых вариантах воплощения N499Q приводит к значительному усилению дезамидирования в этом месте.

В дополнение к дезамидированию другие модификации могут включать изомеризацию (например, по одному или более из D442 и/или D584) (1-15%), фосфорилирование (например, по одному или более из ~ S149, ~ T417, ~ T454, ~ T493, S600 и/или ~ T663), и/или окисления (например, в одной или более позиций ~ W22, ~ M204, ~ M212, W248, W307, M405, M437, M473, W480, W505,

M526, M561, M607, ~W609, W621, M637, W697). Другие позиции могут иметь такие как эти или другие модификации (например, ацетилирование или дополнительное дезамидирование).

Таблица В - Дезамидирование AAV8.AR2.08

| Дезамидирование AAV8.AR2.08 на основе нумерации | % |
|-------------------------------------------------|---|
| VP1                                             |   |

|                       |                                                   |
|-----------------------|---------------------------------------------------|
| SEQ ID NO: 18         |                                                   |
| N57+Дезамидирование   | 65-90, 70-95, 80-95, 75-100,<br>80-100 или 90-100 |
| N94+Дезамидирование   | 1-15                                              |
| ~N254+Дезамидирование | 1-15                                              |
| ~N263+Дезамидирование | 65-90, 70-95, 80-95, 75-100,<br>80-100 или 90-100 |
| ~N305+Дезамидирование | 1-15                                              |
| ~N385+Дезамидирование | 65-90, 70-95, 80-95, 75-100,<br>80-100 или 90-100 |
| ~N514+Дезамидирование | 65-100                                            |
| ~N521+Дезамидирование | 1-10                                              |
| ~N540+Дезамидирование | 65-90, 70-95, 80-95, 75-100,<br>80-100 или 90-100 |
| N590+Дезамидирование  | 0-5                                               |
| Q601+Дезамидирование  | 0-5                                               |
| N653+Дезамидирование  | 0-5                                               |
| N665+Дезамидирование  | 0-5                                               |

В некоторых вариантах воплощения последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая капсидный белок vp1 AAV8.AR2.08, предложена в SEQ ID NO: 17. В других вариантах воплощения последовательность нуклеиновой кислоты, от 70% до 99,9% идентичная SEQ ID NO: 17, может быть выбрана для экспрессии капсидных белков AAV8.AR2.08. В некоторых других вариантах воплощения последовательность нуклеиновой кислоты по меньшей мере на около 75% идентична, по меньшей мере на 80% идентична, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97% идентична или по меньшей мере на 99% - 99,9% идентична SEQ ID NO: 17. Однако другие последовательности нуклеиновых кислот, которые кодируют аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, могут быть выбраны для использования в получении капсидов гAAV8.AR2.08. В некоторых вариантах воплощения последовательность нуклеиновой кислоты имеет последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 17 или последовательность по меньшей мере на 70% - 99% идентичную, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную SEQ ID NO: 17, которая кодирует SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах воплощения последовательность нуклеиновой кислоты имеет последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 17 или последовательность по

меньшей мере от 70% до 99%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную от приблизительно нуклеотида 412 до приблизительно нуклеотида 2214 из SEQ ID NO: 17, которая кодирует капсидный белок vp2 (приблизительноприблизительноприблизительно 138-738 аминокислотных остатков) из SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах воплощения последовательность нуклеиновой кислоты имеет последовательность нуклеиновой кислоты от приблизительно нуклеотида 607 до приблизительно нуклеотида 2214 из SEQ ID NO:17 или последовательность, по меньшей мере на 70% - 99%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную SEQ ID NO: 17, которая кодирует капсидный белок vp3 (приблизительноприблизительноприблизительно 204-738 аминокислотных остатков) из SEQ ID NO:18.

Изобретение также включает последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие мутантный AAV8.2.08, в котором один или более остатков были изменены для уменьшения дезамидирования или других модификаций, которые идентифицированы в данном документе. Такие последовательности нуклеиновых кислот можно использовать для получения мутантного гAAV8.2.08.

В некоторых вариантах воплощения предложен новый капсид AAV5.5.9. Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая AAV, предложена в SEQ ID NO:9, а кодируемая аминокислотная последовательность предложена в SEQ ID NO:10. Выравнивание аминокислотных последовательностей AAV5.5.9, AAV9 и AAVPHP.B показано на ФИГ. 12А. Выравнивание последовательностей нуклеиновой кислоты AAV5.5.9, AAV9 и AAVPHP.B показано на ФИГ.12В-12Е, в одном из вариантов воплощения, рекомбинантный аденоассоциированный вирус (гAAV) имеет капсид AAV5.5.9, содержащий: капсидные белки AAV5.5.9, содержащие: гетерогенную популяцию белков vp1 AAV5.5.9, полученных путем экспрессии из последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует предопределенную аминокислотную последовательность от 1 до 726 из SEQ ID NO: 10, белков vp1, полученных из SEQ ID NO:9, или белков vp1, полученных из последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 70% идентичной SEQ ID NO:9, которая кодирует предопределенную аминокислотную последовательность от 1 до 726 SEQ ID NO:1, гетерологичную популяцию белков vp2 AAV5.5.9, полученных путем экспрессии из последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует предопределенную аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно из аминокислот 137-726 из SEQ ID NO:10, белков vp2, полученных из последовательности, содержащей нуклеотиды по меньшей мере от 409 до 2178 SEQ ID NO:9, или белков vp2, полученных из последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 70% идентичной по меньшей мере нуклеотидам от 577 до 2178 SEQ ID NO:9, которая кодирует предопределенную аминокислотную последовательность по меньшей мере

приблизительно из аминокислот от 137 до 726 из SEQ ID NO:10, и гетерологичную популяцию белков vp3 AAV5.5.9, полученных путем экспрессии из последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует predetermined аминокислотную последовательность по меньшей мере из приблизительно 193-726 аминокислот из SEQ ID NO:10, белков vp3, полученных из последовательности, содержащей по меньшей мере нуклеотиды с 577 по 2178 SEQ ID NO:9, или белков vp3, полученных из последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 70% идентичной по меньшей мере нуклеотидам от 577 до 2178 SEQ ID NO:9, которая кодирует predetermined аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно из аминокислот от 193 до 726 из SEQ ID NO:10.

Дополнительно или альтернативно капсид AAV5.5.9 содержит: гетерогенную популяцию белков vp1, которые являются продуктом последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, гетерогенную популяцию белков vp2, которые являются продуктом последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно из аминокислот 137-726 из SEQ ID NO: 10, гетерогенную популяцию белков vp3, которые являются продуктом последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей по меньшей мере аминокислоты от 193 до 726 из SEQ ID NO:10, где белки vp1, vp2 и vp3 содержат субпопуляции с аминокислотными модификациями, включающими по меньшей мере два сильно дезамидированных аспарагина (N) в парах аспарагин-глицин в SEQ ID NO: 10 и, необязательно, дополнительно включая субпопуляции, содержащие другие дезамидированные аминокислоты, где дезамидирование приводит к замене аминокислоты.

Таблица С - дезамидирование AAV5.5.9

| Дезамидирование AAV5.5.9 на основе нумерации VP1<br>SEQ ID NO: 10 | %                                              |
|-------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| N35+Дезамидирование                                               | 0-15, 1-10                                     |
| ~N57+Дезамидирование                                              | 65-90, 70-95, 80-95, 75-100, 80-100 или 90-100 |
| N113+Дезамидирование                                              | 0-15                                           |
| ~N204+Дезамидирование                                             | 0-20, 1-20                                     |
| N217+Дезамидирование                                              | 0-5, 1-5                                       |
| ~N243+Дезамидирование                                             | 0-25, 1-25                                     |
| Q249+Дезамидирование                                              | 1-20                                           |
| N293/294+Дезамидирование                                          | 10-45, 15-40                                   |
| N304+Дезамидирование                                              | 1-10                                           |
| N309+Дезамидирование                                              | 1-2                                            |

|                                                                   |                                                |
|-------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| Дезамидирование AAV5.5.9 на основе нумерации VP1<br>SEQ ID NO: 10 | %                                              |
| Q311+Дезамидирование                                              | 1-2                                            |
| ~N319+Дезамидирование                                             | 65-90, 70-95, 80-95, 75-100, 80-100 или 90-100 |
| N399/400+Дезамидирование                                          | 5-40, 10-40, 15-35                             |
| ~N442+Дезамидирование                                             | 65-90, 70-95, 80-95, 75-100, 80-100 или 90-100 |
| N467+Дезамидирование                                              | 1-5                                            |
| N502+Дезамидирование                                              | 65-90, 70-95, 80-95, 75-100, 80-100 или 90-100 |
| N505+Дезамидирование                                              | 5-25, 10-25                                    |
| ~Q589+Дезамидирование                                             | 5-30, 10-30                                    |
| N618+Дезамидирование                                              | 1-15, 5-10                                     |
| ~N641+Дезамидирование                                             | 1-15, 5-10                                     |
| N653+Дезамидирование                                              | 1-15, 5-10                                     |
| ~N658+Дезамидирование                                             | 5-40, 10-30                                    |
| N694+Дезамидирование                                              | 0-5                                            |
| ~N699+Дезамидирование                                             | 1-10                                           |

В некоторых вариантах воплощения последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая капсидный белок vp1 AAV5.5.9, предложена в SEQ ID NO: 9. В других вариантах воплощения последовательность нуклеиновой кислоты, от 70% до 99,9% идентичная SEQ ID NO: 9, может быть выбрана для экспрессии капсидных белков AAV5.5.9. В некоторых других вариантах воплощения последовательность нуклеиновой кислоты по меньшей мере на около 75% идентична, по меньшей мере на 80% идентична, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97% идентична или по меньшей мере на 99% - 99,9% идентична SEQ ID NO: 9. Однако другие последовательности нуклеиновых кислот, которые кодируют аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, могут быть выбраны для использования в получении капсидов rAAV5.5.9. В некоторых вариантах воплощения последовательность нуклеиновой кислоты имеет последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 10 или последовательность по меньшей мере на 70% - 99% идентичную, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную SEQ ID NO: 9, которая кодирует SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах воплощения последовательность нуклеиновой кислоты имеет последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 9 или последовательность по меньшей мере от 70% до 99%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере

мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную от приблизительно нуклеотида 409 до приблизительно нуклеотида 2178 из SEQ ID NO: 9, которая кодирует капсидный белок vp2 (приблизительноприблизительноприблизительно 137-726 аминокислотных остатков) из SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах воплощения последовательность нуклеиновой кислоты имеет последовательность нуклеиновой кислоты от приблизительно нуклеотида 577 до приблизительно нуклеотида 2178 из SEQ ID NO:9 или последовательность, по меньшей мере на 70% - 99%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% идентичную нуклеотидам от 577 до 2178 SEQ ID NO: 9, которая кодирует капсидный белок vp3 (приблизительноприблизительноприблизительно 193-726 аминокислотных остатков) из SEQ ID NO:10.

Изобретение также включает последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие мутантный AAV5.5.9, в котором один или более остатков были изменены для уменьшения дезамидирования или других модификаций, которые идентифицированы в данном документе. Такие последовательности нуклеиновых кислот можно использовать для получения мутантного гAAV5.5.9.

#### I. Векторы гAAV

Как указано выше, новые последовательности и белки AAV используются для получения гAAV, а также могут быть использованы в рекомбинантных векторах AAV, которые могут быть векторами для доставки антисмысловых сигналов, векторами для генной терапии или векторами вакцин. Кроме того, сконструированные капсиды AAV, описанные в настоящем документе, можно использовать для создания векторов гAAV для доставки ряда подходящих молекул нуклеиновых кислот к клеткам и тканям-мишеням.

Геномные последовательности, которые упакованы в капсид AAV и доставляются в клетку-хозяин, обычно состоят, как минимум, из трансгена и его регуляторных последовательностей, а также инвертированных концевых повторов AAV (ITR). Как одноцепочечный AAV, так и самокомплементарный (sc) AAV охвачены гAAV. Трансген представляет собой кодирующую последовательность нуклеиновой кислоты, гетерогенную векторным последовательностям, которая кодирует полипептид, белок, функциональную молекулу РНК (например, микроРНК, ингибитор микроРНК) или другой представляющий интерес продукт гена. Кодирующая последовательность нуклеиновой кислоты функционально связана с регуляторными компонентами таким образом, что позволяет транскрипцию, трансляцию и/или экспрессию трансгена в клетке ткани-мишени.

Последовательности AAV вектора обычно включают цис-действующие 5' и 3' последовательности инвертированных концевых повторов (см., например, B.J. Carter, в «Handbook of Parvoviruses», ed., P. Tijsser, CRC Press, pp. 155 168 (1990)). Последовательности ITR имеют длину приблизительно 145 п.н. Предпочтительно, в молекуле используются по существу полные последовательности, кодирующие ITR, хотя

допустима некоторая незначительная модификация этих последовательностей. Возможность модифицировать эти ITR-последовательности находится в компетенции специалиста в данной области техники. (См., например, такие тексты, как Sambrook et al., «Molecular Cloning. A Laboratory Manual», 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1989); и K. Fisher et al., J. Virol., 70:520-532 (1996)). Примером такой молекулы, используемой в настоящем изобретении, является «цис-действующая» плаزمид, содержащая трансген, в которой выбранная последовательность трансгена и связанные регуляторные элементы фланкированы 5'- и 3'-последовательностями ITR AAV. В одном из вариантов воплощения ITR взяты из AAV, отличного от того, который поставляет капсид, в результате чего получается псевдотипированный вектор. В одном из вариантов воплощения последовательности ITR взяты из AAV2. Была описана укороченная версия 5' ITR, названная  $\Delta$ ITR, в которой удалены D-последовательность и сайт конечного разрешения (trs). В других вариантах воплощения используются полноразмерные 5' и 3' ITR AAV. Однако можно выбрать ITR из других источников AAV. Если источником ITR является AAV2, а капсидом AAV является другой источник AAV, полученный вектор можно назвать псевдотипированным. Однако могут быть подходящими другие конфигурации этих элементов.

В дополнение к основным элементам, идентифицированным выше для рекомбинантного вектора AAV, вектор также включает необходимые стандартные элементы управления, которые функционально связаны с трансгеном таким образом, чтобы обеспечить его транскрипцию, трансляцию и/или экспрессию в клетке, трансфицированной плазмидным вектором или инфицированной вирусом, продуцируемым согласно настоящему изобретению. В контексте данного документа, «функционально связанные» последовательности включают, как последовательности контроля экспрессии, которые примыкают к представляющему интерес гену, так и последовательности контроля экспрессии, которые действуют в транс-конфигурации или на расстоянии, чтобы контролировать интересующий ген.

Элементы регуляторного контроля обычно содержат промоторную последовательность как часть последовательностей контроля экспрессии, например, расположенную между выбранной 5' ITR-последовательностью и кодирующей последовательностью. В векторах, описанных в данном документе, можно использовать конститутивные промоторы, регулируемые промоторы [см., например, WO 2011/126808 и WO 2013/04943], тканеспецифические промоторы или промотор, реагирующий на физиологические сигналы. Промотор(ы) может(гут) быть выбран(ы) из различных источников, например, раннего энхансера/промотора цитомегаловируса человека (CMV), раннего энхансера/промотора SV40, промотора полиомавируса JC, промоторов основного белка миелина (MBP) или глиального фибриллярного кислого белка (GFAP), промотора, ассоциированного с латентностью (LAP) вируса простого герпеса (HSV-1), промотора длинных концевых повторов (LTR) вируса саркомы Рауса (RSV), нейрон-специфического промотора (NSE), промотора тромбоцитарного фактора роста (PDGF), hSYN, промотора

меланин-концентрирующего гормона (MCH), CBA, промотора матричного металлопротеина (MPP) и промотора бета-актина курицы. В одном из вариантов воплощения промотор представляет собой промотор, специфичный для печени, такой как промотор, обозначенный как LSP, приведенный в данном документе в качестве примера.

В дополнение к промотору вектор может содержать одну или более других подходящих последовательностей инициации, терминации, энхансера транскрипции, эффективных сигналов процессинга РНК, таких как сигналы сплайсинга и полиаденилирования (полиА); последовательностей, которые стабилизируют цитоплазматическую мРНК, например WPRE; последовательностей, которые повышают эффективность трансляции (т.е. консенсусная последовательность Козака); последовательностей, повышающих стабильность белка; и, если желательно, последовательностей, которые усиливают секрецию кодируемого продукта. Примером подходящего энхансера является энхансер CMV. Другие подходящие энхансеры включают те, которые подходят для желаемых особенностей в ткани-мишени. В одном из вариантов воплощения кассета экспрессии содержит один или более энхансеров экспрессии. В одном из вариантов воплощения кассета экспрессии содержит два или более энхансеров экспрессии. Эти энхансеры могут быть одинаковыми или отличаться друг от друга. Например, энхансер может включать ранний энхансер CMV. Этот энхансер может присутствовать в двух копиях, расположенных рядом друг с другом. Альтернативно, двойные копии энхансера могут быть разделены одной или более последовательностей. В еще одном из вариантов воплощения кассета экспрессии дополнительно содержит интрон, например интрон бета-актина курицы. Другие подходящие интроны включают интроны, известные в данной области техники, например такие, которые описаны в WO 2011/126808. Примеры подходящих последовательностей polyA включают, например, SV40, SV50, гормон роста крупного рогатого скота (bGH), гормон роста человека и синтетические polyA. Необязательно, одна или более последовательностей могут быть выбраны для стабилизации мРНК. Примером такой последовательности является модифицированная последовательность WPRE, которая может быть сконструирована слева от последовательности polyA и справа от кодирующей последовательности [см., например, MA Zanta-Boussif, et al, Gene Therapy (2009) 16: 605-619].

Эти gAAV особенно хорошо подходят для доставки генов в терапевтических целях и для иммунизации, включая индукцию защитного иммунитета. Дополнительно, композиции по настоящему изобретению можно также использовать для получения желаемого генного продукта *in vitro*. Для получения *in vitro* желаемый продукт (например, белок) может быть получен из желаемой культуры после трансфекции клеток-хозяев с помощью gAAV, содержащего молекулу, кодирующую желаемый продукт, и культивирования культуры клеток в условиях, допускающих экспрессию. Затем экспрессированный продукт может быть очищен и выделен, если желательно. Подходящие методы трансфекции, культивирования клеток, очистки и выделения

известны специалистам в данной области техники.

#### Терапевтические трансгены

Применимые продукты, кодируемые трансгеном, включают различные генные продукты, которые заменяют дефективный или дефектный ген, инактивируют или «нокаутуют», или «нокдаунируют», или снижают экспрессию гена, который экспрессируется на нежелательно высоком уровне, или доставку генного продукта, обладающего желаемым терапевтическим эффектом. В большинстве вариантов воплощения терапия будет представлять собой «соматическую генную терапию», то есть перенос генов в клетку организма, которая не производит сперматозоиды или яйцеклетки. В некоторых вариантах воплощения трансгены экспрессируют белки, имеющие последовательность нативных человеческих последовательностей. Однако в других вариантах воплощения экспрессируются синтетические белки. Такие белки могут быть предназначены для лечения людей или, в других вариантах воплощения, предназначены для лечения животных, включая домашних животных, таких как популяции собак или кошек, или для лечения домашнего скота или других животных, которые вступают в контакт с популяциями людей.

Примеры подходящих генных продуктов могут включать продукты, связанные с семейной гиперхолестеринемией, мышечной дистрофией, кистозным фиброзом и редкими или орфанными заболеваниями. Примеры такого редкого заболевания могут включать спинальную мышечную атрофию (СМА), болезнь Хантингтона, синдром Ретта (например, метил-СрG-связывающий белок 2 (MeCP2); UniProtKB - P51608), боковой амиотрофический склероз (БАС), мышечную дистрофию Дюшенна, Атаксию Фридрихса (например, фратаксин), програнулин (PRGN) (связанный с дегенерациями головного мозга, не связанными с болезнью Альцгеймера, включая лобно-височную деменцию (FTD), прогрессирующую нелегкую афазию (PNFA) и семантическую деменцию) и другие. См., например, [www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease\\_Search\\_List.php](http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search_List.php); [rarediseases.info.nih.gov/diseases](http://rarediseases.info.nih.gov/diseases).

Примеры подходящих генов могут включать, например, гормоны и факторы роста и дифференциации, включая, без ограничения, инсулин, глюкагон, глюкагоноподобный пептид -1 (GLP1), гормон роста (GH), паратироидный гормон (PTH), фактор высвобождения гормона роста (GRF), фолликулостимулирующий гормон (ФСГ), лютеинизирующий гормон (ЛГ), хорионический гонадотропин человека (ХГЧ), фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), ангиопоэтины, ангиостатин, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (GCSF), эритропоэтин (EPO), (включая, например, эритропоэтин человека, собаки или кошки), фактор роста соединительной ткани (CTGF), нейтрофические факторы, включая, например, основной фактор роста фибробластов (bFGF), кислотный фактор роста фибробластов (aFGF), эпидермальный фактор роста (EGF), фактор роста, производный от тромбоцитов (PDGF), инсулиновые факторы роста I и II (IGF-I и IGF-II), любой из суперсемейства трансформирующих факторов роста  $\alpha$ , включая TGF $\alpha$ , активины, ингибины или любой из морфогенных белков кости (BMP)

BMP 1-15, любой из семейства факторов роста херегулина/нейрегулина/ARIA/фактора дифференцировки *neu* (NDF), , фактор роста нервов (NGF), нейротрофический фактор головного мозга (BDNF), нейротрофины NT-3 и NT-4/5, цилиарный нейротрофический фактор (CNTF), нейротрофический фактор, полученный из глиальной клеточной линии (GDNF), нейрурин, агрин, любой из семейства семафоринов/коллапсинов, нетрин-1 и нетрин-2, фактор роста гепатоцитов (HGF), эфрины, ноггин, *sonic hedgehog* и тирозингидроксилазу.

Другие применимые трансгенные продукты включают белки, которые регулируют иммунную систему, включая, помимо прочего, цитокины и лимфокины, такие как тромбопоэтин (TPO), интерлейкины (IL), от IL-1 до IL-36 (включая, например, человеческие интерлейкины IL-1, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-8, IL-12, IL-11, IL-12, IL-13, IL-18, IL-31, IL-35), моноцитарный хемоаттрактантный белок, фактор ингибирования лейкемии, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор, лиганд Fas, факторы некроза опухоли  $\alpha$  и  $\beta$ , интерфероны  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$ , фактор стволовых клеток, лиганд *flk-2/flt3*. В настоящем изобретении также можно использовать генные продукты, продуцируемые иммунной системой. К ним относятся, без ограничений, иммуноглобулины IgG, IgM, IgA, IgD и IgE, химерные иммуноглобулины, гуманизированные антитела, одноцепочечные антитела, рецепторы Т-клеток, рецепторы химерных Т-клеток, одноцепочечные рецепторы Т-клеток, молекулы МНС класса I и класса II, а также сконструированные иммуноглобулины и молекулы МНС. Например, в некоторых вариантах воплощения антитела против rAAV могут быть разработаны для доставки собачьих или кошачьих антител, например, таких как анти-IgE, анти-IL31, анти-CD20, анти-NGF, анти-GnRH. Применимые генные продукты также включают регуляторные белки комплемента, такие как регуляторные белки комплемента, белок мембранного кофактора (MCP), фактор ускорения распада (DAF), CR1, CF2, CD59 и ингибитор эстеразы C1 (C1-INH).

Другие применимые генные продукты включают любой из рецепторов гормонов, факторов роста, цитокинов, лимфокинов, регуляторных белков и белков иммунной системы. Изобретение охватывает рецепторы для регуляции холестерина и/или липидной модуляции, включая рецептор липопротеинов низкой плотности (LDL), рецептор липопротеинов высокой плотности (HDL), рецептор липопротеинов очень низкой плотности (VLDL) и рецепторы скавенджеров. Изобретение также охватывает генные продукты, такие как члены суперсемейства рецепторов стероидных гормонов, включая рецепторы глюкокортикоидов и рецепторы эстрогенов, рецепторы витамина D и другие ядерные рецепторы. Кроме того, применимые генные продукты включают факторы транскрипции, такие как *jun*, *fos*, *max*, *mad*, фактор сывороточного ответа (SRF), AP-1, AP2, *myb*, *MyoD* и миогенин, белки, содержащие ETS-бокс, TFE3, E2F, ATF1, ATF2, ATF3, ATF4, ZF5, NFAT, CREB, HNF-4, C/EBP, SP1, белки, связывающие CCAAT-бокс, фактор регуляции интерферона (IRF-1), опухолевый белок Вильмса, ETS-связывающий белок, STAT, белки, связывающие GATA-бокс, например GATA-3, и семейство белков

«крылатой спирали» из семейства forkhead.

Другие применимые генные продукты включают карбамоилсинтетазу I, орнитинтранскарбамилазу (OTC), аргиносукцинатсинтетазу, аргиносукцинатлиазу (ASL) для лечения дефицита аргиносукцинатлиазы, аргиназу, фумарилацетатгидролазу, фенилаланингидроксилазу, альфа-1 антитрипсин, альфа-фетопrotein макаки-резус (AFP), хорионический гонадотропин макаки-резус (CG), глюкозо-6-фосфатазу, порфобилиногендэаминазу, цистатион-бета-синтазу, декарбоксилазу кетокислоты с разветвленной цепью, альбумин, изовалерил-КоА-дегидрогеназу, пропионил-КоА-карбоксилазу, метилмалонил-КоА мутазу, глутарил-КоА-дегидрогеназу, инсулин, бета-глюкозидазу, пируваткарбоксилат, фосфорилазу печени, киназу-фосфорилазу, глициндекарбоксилазу, Н-белок, Т-белок, последовательность трансмембранного регулятора муковисцидоза (CFTR) и продукт гена дистрофина [например, мини- или микродистрофин]. Другие применимые генные продукты включают ферменты, которые могут применяться в заместительной ферментной терапии, которая применяется при различных состояниях, возникающих в результате недостаточной активности фермента. Например, ферменты, содержащие маннозо-6-фосфат, можно использовать в терапии лизосомных болезней накопления (например, подходящий ген включает ген, кодирующий  $\beta$ -глюкуронидазу (GUSB)).

В некоторых вариантах воплощения гAAV можно использовать в системах редактирования генов, причем эта система может включать один гAAV или совместное введение нескольких стоков гAAV. Например, гAAV может быть сконструирован для доставки SpCas9, SaCas9, ARCUS, Cpf1 и других подходящих конструкций для редактирования генов.

Другие применимые генные продукты включают те, которые используются для лечения гемофилии, включая гемофилию В (включая фактор IX) и гемофилию А (включая фактор VIII и его варианты, такие как легкая цепь и тяжелая цепь гетеродимера и В-удаленный домен; Патент США № 6 200 560 и Патент США № 6 221 349). В некоторых вариантах воплощения миниген содержит первые 57 пар оснований тяжелой цепи фактора VIII, которая кодирует сигнальную последовательность из 10 аминокислот, а также последовательность полиаденилирования гормона роста человека (hGH). В альтернативных вариантах воплощения миниген дополнительно содержит домены A1 и A2, а также 5 аминокислот от N-конца В-домена и/или 85 аминокислот С-конца В-домена, а также домены A3, C1 и C2. В других вариантах воплощения нуклеиновые кислоты, кодирующие тяжелую цепь и легкую цепь фактора VIII, представлены в едином минигене, разделенном 42 нуклеиновыми кислотами, кодирующими 14 аминокислот домена В [Патент США № 6 200 560].

Другие применимые генные продукты включают неприродные полипептиды, такие как химерные или гибридные полипептиды, имеющие неприродную аминокислотную последовательность, содержащую вставки, делеции или аминокислотные замены. Например, одноцепочечные сконструированные иммуноглобулины могут быть полезны

некоторым пациентам с ослабленным иммунитетом. Другие типы неприродных генных последовательностей включают антисмысловые молекулы и каталитические нуклеиновые кислоты, такие как рибозимы, которые можно использовать для снижения сверхэкспрессии мишени.

Снижение и/или модуляция экспрессии гена особенно желательны для лечения гиперпролиферативных состояний, характеризующихся гиперпролиферирующими клетками, таких как рак и псориаз. Полипептиды-мишени включают те полипептиды, которые продуцируются исключительно или на более высоких уровнях в гиперпролиферативных клетках по сравнению с нормальными клетками. Антигены-мишени включают полипептиды, кодируемые онкогенами, такими как *myb*, *myc*, *fun*, и ген транслокации *bcr/abl*, *ras*, *src*, *P53*, *neu*, *trk* и *EGFR*. В дополнение к онкогенным продуктам в качестве антигенов-мишеней полипептиды-мишени для противоракового лечения и режимов защиты включают вариабельные области антител, продуцируемых В-клеточными лимфомами, и вариабельные области Т-клеточных рецепторов Т-клеточных лимф, которые в некоторых вариантах воплощения также используются в качестве антигенов-мишеней для аутоиммунного заболевания. Другие полипептиды, ассоциированные с опухолями, могут быть использованы в качестве полипептидов-мишеней, таких как полипептиды, которые обнаруживаются на более высоких уровнях в опухолевых клетках, включая полипептид, распознаваемый моноклональным антителом 17-1А, и полипептиды, связывающие фолат.

Другие подходящие терапевтические полипептиды и белки включают те, которые могут применяться для лечения индивидуумов, страдающих аутоиммунными заболеваниями и расстройствами, путем обеспечения широкого защитного иммунного ответа против мишеней, которые связаны с аутоиммунитетом, включая клеточные рецепторы и клетки, которые продуцируют «самонаправленные» антитела. Аутоиммунные заболевания, опосредованные Т-клетками, включают ревматоидный артрит (РА), рассеянный склероз (РС), синдром Шегрена, саркоидоз, инсулинозависимый сахарный диабет (IDDM), аутоиммунный тиреоидит, реактивный артрит, анкилозирующий спондилит, склеродермию, полимиорозит, дерматомиозит, псориазит, васкулит, гранулематоз Вегенера, болезнь Крона и язвенный колит. Каждое из этих заболеваний характеризуется рецепторами Т-клеток (TCR), которые связываются с эндогенными антигенами и инициируют воспалительный каскад, связанный с аутоиммунными заболеваниями.

Дополнительные иллюстративные гены, которые могут доставляться через gAAV, включают, без ограничения, глюкозо-6-фосфатазу, связанную с заболеванием накопления гликогена или дефицитом типа 1А (GSD1), фосфоенолпируват-карбоксикиназу (PEPCK), связанную с дефицитом PEPCK; циклин-зависимый киназо-подобный белок 5 (CDKL5), также известный как серин/треониновая киназа 9 (STK9), связанная с припадками и тяжелыми нарушениями развития нервной системы; галактозо-1-фосфатуридилтрансферазу, связанную с галактоземией; фенилаланингидроксилазу,

связанную с фенилкетонурией (PKU); альфа-кетокислотную дегидрогеназу с разветвленной цепью, ассоциированную с болезнью мочи с запахом кленового сиропа; фумарилацетоацетатгидролазу, связанную с тирозинемией 1 типа; мутазу метилмалонил-КоА, связанную с метилмалоновой ацидемией; ацил-КоА-дегидрогеназу со средней длиной цепи, связанную с дефицитом ацетил-КоА со средней длиной цепи; орнитин-транскарбамилазу (OTC), связанную с дефицитом орнитин-транскарбамилазы; синтетазу аргининоянтарной кислоты (ASS1), связанную с цитруллинемией; дефицитом лецитин-холестерина ацилтрансферазы (LXAT); аметилмалоновой ацидемией (MMA); Болезнью Ниманна-Пика, тип C1); пропионовой ацидемией (PA); белок рецептора липопротеинов низкой плотности (LDLR), связанный с семейной гиперхолестеринемией (FH); UDP-глюкуронозилтрансферазу, связанную с болезнью Криглера-Наджара; аденозиндезаминазу, связанную с тяжелым комбинированным иммунодефицитным заболеванием; гипоксантингуанинфосфорибозилтрансферазу, связанную с подагрой и синдромом Леша-Ньяна; биотимидазу, связанную с дефицитом биотимидазы; альфа-галактозидазу А (α-Gal A), связанную с болезнью Фабри; АТР7В, связанный с болезнью Вильсона; бета-глюкоцереброзидазу, связанную с болезнью Гоше 2 и 3 типа; белок пероксисомной мембраны 70 кДа, связанный с синдромом Зеллвегера; арилсульфатазу А (ARSA), связанную с метакроматической лейкодистрофией, фермент галактоцереброзидазу (GALC), связанную с болезнью Краббе, альфа-глюкозидазу (GAA), связанную с болезнью Помпе; ген сфингомиелиназы (SMPD1), связанный с болезнью Нимана-Пика типа А; аргининосукцинатсинтазу, связанную с цитруллинемией типа II у взрослых (CTLN2); карбамоилфосфатсинтазу 1 (CPS1), связанную с нарушениями цикла мочевины; белок выживания мотонейрона (SMN), связанный со спинальной мышечной атрофией; церамидазу, связанную с липогранулематозом Фарбера; b-гексозаминидазу, связанную с ганглиозидозом GM2 и болезнями Тей-Сакса и Сандхоффа; аспартилглюкозаминидазу, связанную с аспартил-глюкозаминурией; α-фукозидазу, связанную с фукозидозом; α-маннозидазу, связанную с альфа-маннозидозом; порфобилиногендезаминазу, связанную с острой перемежающейся порфирией (AIP); альфа-1-антитрипсин для лечения дефицита альфа-1-антитрипсина (эмфиземы); эритропоэтин для лечения анемии, вызванной талассемией или почечной недостаточностью; фактор роста эндотелия сосудов, ангиопоэтин-1 и фактор роста фибробластов для лечения ишемических заболеваний; тромбомодулин и ингибитор пути тканевого фактора для лечения закупоренных кровеносных сосудов, как, например, при атеросклерозе, тромбозе или эмболиях; декарбоксилазу ароматических аминокислот (AADC) и тирозингидроксилазу (TH) для лечения болезни Паркинсона; бета-адренергический рецептор, антисмысловый к фосфоламбану или его мутантную форму, аденозинтрифосфатазу-2 сарко (эндо) плазматического ретикулума (SERCA2) и сердечную аденилатциклазу для лечения застойной сердечной недостаточности; ген-супрессор опухоли, такой как p53, для лечения различных видов рака; цитокин, такой как один из различных интерлейкинов, для лечения воспалительных и иммунных нарушений

и рака; дистрофин или минидистрофин и утrophин или миниутrophин для лечения мышечных дистрофий; и инсулин или GLP-1 для лечения диабета.

Дополнительные гены и заболевания, представляющие интерес, включают, например, заболевания, связанные с геном дистонина, такие как наследственная сенсорная и вегетативная невропатия типа VI (ген DST кодирует дистонин; могут потребоваться двойные векторы AAV из-за размера белка (~ 7570 аминокислотных остатков); заболевания, связанные с SCN9A, при которых мутанты с потерей функции приводят к неспособности чувствовать боль, а мутанты с усилением функции вызывают болевые состояния, такие как эритромелалгия. Другим заболеванием является тип 1F и 2E Шарко-Мари-Тута из-за мутаций в гене NEFL (легкая цепь нейрофиламента), характеризуется прогрессирующей периферической моторной и сенсорной невропатией с различными клиническими и электрофизиологическими проявлениями.

В некоторых вариантах воплощения изобретения rAAV, описанный в настоящем документе, можно использовать для лечения нарушений, связанных с мукополисахаридозом (MPS). Такой rAAV может содержать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую  $\alpha$ -L-идуронидазу (IDUA), для лечения MPS I (синдромы Гурлера, Гурлера-Шейе и Шейе); последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую идуронат-2-сульфатазу (IDS), для лечения MPS II (синдром Хантера); последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую сульфамидазу (SGSH), для лечения MPSIII A, B, C и D (синдром Санфилиппо); последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую N-ацетилгалактозамин-6-сульфатсульфатазу (GALNS), для лечения MPS IV A и B (синдром Моркио); последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую арилсульфатазу B (ARSB), для лечения MPS VI (синдром Марото-Лами); последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую гиалуронидазу, для лечения MPSI IX (дефицит гиалуронидазы) и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую бета-глюкуронидазу, для лечения MPS VII (синдром Слая).

#### Иммуногенные трансгены

В некоторых вариантах воплощения вектор rAAV, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую продукт гена, связанного с раком (например, супрессоры опухоли), можно использовать для лечения рака путем введения rAAV, несущего вектор rAAV, субъекту, страдающему раком. В некоторых вариантах воплощения вектор rAAV, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую малую интерферирующую нуклеиновую кислоту (например, shRNA, микроРНК), которая ингибирует экспрессию продукта гена, связанного с раком (например, онкогенов), может быть использован для лечения рака путем введения rAAV, несущего вектор rAAV субъекту, страдающему раком. В некоторых вариантах воплощения вектор rAAV, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую продукт гена, связанного с раком (или функциональную РНК, которая ингибирует экспрессию гена, связанного с раком), может использоваться в исследовательских целях, например, для изучения рака или для идентификации терапевтических средств для лечения рака. Ниже приводится неограничивающий список

типичных генов, которые, как известно, связаны с развитием рака (например, онкогены и супрессоры опухолей): AARS, ABCB1, ABCC4, ABI2, ABL1, ABL2, ACK1, ACP2, ACY1, ADSL, AK1, AKR1C2, AKT1, ALB, ANPEP, ANXA5, ANXA7, AP2M1, APC, ARHGAP5, ARHGEF5, ARID4A, ASNS, ATF4, ATM, ATP5B, ATP5O, AXL, BARD1, BAX, BCL2, BHLHB2, BLMH, BRAF, BRCA1, BRCA2, BTK, CANX, CAP1, CAPN1, CAPNS1, CAV1, CBBF, CBLB, CCL2, CCND1, CCND2, CCND3, CCNE1, CCT5, CCYR61, CD24, CD44, CD59, CDC20, CDC25, CDC25A, CDC25B, CDC2L5, CDK10, CDK4, CDK5, CDK9, CDKL1, CDKN1A, CDKN1B, CDKN1C, CDKN2A, CDKN2B, CDKN2D, CEBPG, CENPC1, CGRRF1, CHAF1A, CIB1, CKMT1, CLK1, CLK2, CLK3, CLNS1A, CLTC, COL1A1, COL6A3, COX6C, COX7A2, CRAT, CRHR1, CSF1R, CSK, CSNK1G2, CTNNA1, CTNNB1, CTPS, CTSC, CTSD, CUL1, CYR61, DCC, DCN, DDX10, DEK, DHCR7, DHRS2, DHX8, DLG3, DVL1, DVL3, E2F1, E2F3, E2F5, EGFR, EGR1, EIF5, EPHA2, ERBB2, ERBB3, ERBB4, ERCC3, ETV1, ETV3, ETV6, F2R, FASTK, FBN1, FBN2, FES, FGFR1, FGR, FKBP8, FN1, FOS, FOSL1, FOSL2, FOXG1A, FOXO1A, FRAP1, FRZB, FTL, FZD2, FZD5, FZD9, G22P1, GAS6, GCN5L2, GDF15, GNA13, GNAS, GNB2, GNB2L1, GPR39, GRB2, GSK3A, GSPT1, GTF2I, HDAC1, HDGF, HMMR, HPRT1, HRB, HSPA4, HSPA5, HSPA8, HSPB1, HSPH1, HYAL1, HYOU1, ICAM1, ID1, ID2, IDUA, IER3, IFITM1, IGF1R, IGF2R, IGFBP3, IGFBP4, IGFBP5, IL1B, ILK, ING1, IRF3, ITGA3, ITGA6, ITGB4, JAK1, JARID1A, JUN, JUNB, JUND, K-ALPHA-1, KIT, KITLG, KLK10, KPNA2, KRAS2, KRT18, KRT2A, KRT9, LAMB1, LAMP2, LCK, LCN2, LEP, LITAF, LRPAP1, LTF, LYN, LZTR1, MADH1, MAP2K2, MAP3K8, MAPK12, MAPK13, MAPKAPK3, MAPRE1, MARS, MAS1, MCC, MCM2, MCM4, MDM2, MDM4, MET, MGST1, MICB, MLLT3, MME, MMP1, MMP14, MMP17, MMP2, MNDA, MSH2, MSH6, MT3, MYB, MYBL1, MYBL2, MYC, MYCL1, MYCN, MYD88, MYL9, MYLK, NEO1, NF1, NF2, NFKB1, NFKB2, NFSF7, NID, NINE, NMBR, NME1, NME2, NME3, NOTCH1, NOTCH2, NOTCH4, NPM1, NQO1, NR1D1, NR2F1, NR2F6, NRAS, NRG1, NSEP1, OSM, PA2G4, PABPC1, PCNA, PCTK1, PCTK2, PCTK3, PDGFA, PDGFB, PDGFRA, PDPK1, PEA15, PFDN4, PFDN5, PGAM1, PHB, PIK3CA, PIK3CB, PIK3CG, PIM1, PKM2, PKMYT1, PLK2, PPARD, PPARG, PPIH, PPP1CA, PPP2R5A, PRDX2, PRDX4, PRKAR1A, PRKCBP1, PRNP, PRSS15, PSMA1, PTCH, PTEN, PTGS1, PTMA, PTN, PTPRN, RAB5A, RAC1, RAD50, RAF1, RALBP1, RAP1A, RARA, RARB, RASGRF1, RB1, RBBP4, RBL2, REA, REL, RELA, RELB, RET, RFC2, RGS19, RHOA, RHOB, RHOC, RHOD, RIPK1, RPN2, RPS6 KB1, RRM1, SARS, SELENBP1, SEMA3C, SEMA4D, SEPP1, SERPINH1, SFN, SFPQ, SFRS7, SHB, SHH, SIAH2, SIVA, SIVA TP53, SKI, SKIL, SLC16A1, SLC1A4, SLC20A1, SMO, сфингомиелинфосфодиэстераза 1 (SMPD1), SNAI2, SND1, SNRBP2, SOCS1, SOCS3, SOD1, SORT1, SPINT2, SPRY2, SRC, SRPX, STAT1, STAT2, STAT3, STAT5B, STC1, TAF1, TBL3, TBRG4, TCF1, TCF7L2, TFAP2C, TFDP1, TFDP2, TGFA, TGFB1, TGFB1, TGFB2, TGFB3, THBS1, TIE, TIMP1, TIMP3, TJP1, TK1, TLE1, TNF, TNFRSF10A, TNFRSF10B, TNFRSF1A, TNFRSF1B, TNFRSF6, TNFRSF7, TNK1, TOB1, TP53, TP53BP2, TP5313, TP73, TPBG, TPT1, TRADD, TRAM1, TRRAP, TSG101, TUFM, TXNRD1, TYRO3,

UBC, UBE2L6, UCHL1, USP7, VDAC1, VEGF, VHL, VIL2, WEE1, WNT1, WNT2, WNT2B, WNT3, WNT5A, WT1, XRCC1, YES1, YWHAB, YWHAZ, ZAP70 и ZNF9.

Вектор гAAV может содержать в качестве трансгена нуклеиновую кислоту, кодирующую белок или функциональную РНК, которая модулирует апоптоз. Ниже приводится неограничивающий список генов, связанных с апоптозом, и нуклеиновых кислот, кодирующих продукты этих генов и их гомологов и кодирующих малые интерферирующие нуклеиновые кислоты (например, shRNA, микроРНК), которые ингибируют экспрессию этих генов, а их гомологи могут использоваться в качестве трансгенов в некоторых вариантах воплощения изобретения: RPS27A, ABL1, AKT1, APAF1, BAD, BAG1, BAG3, BAG4, BAK1, BAX, BCL10, BCL2, BCL2A1, BCL2L1, BCL2L10, BCL2L11, BCL2L12, BCL2L13, BCL2L2, BCLAF1, BFAR, BID, BIK, NAIP, BIRC2, BIRC3, XIAP, BIRC5, BIRC6, BIRC7, BIRC8, BNIP1, BNIP2, BNIP3, BNIP3L, BOK, BRAF, CARD10, CARD11, NLRC4, CARD14, NOD2, NOD1, CARD6, CARDS, CASP1, CASP10, CASP14, CASP2, CASP3, CASP4, CASP5, CASP6, CASP7, CASP8, CASP9, CFLAR, CIDEA, CIDEB, CRADD, DAPK1, DAPK2, DFFA, DFFB, FADD, GADD45A, GDNF, HRK, IGF1R, LTA, LTBR, MCL1, NOL3, PYCARD, RIPK1, RIPK2, TNF, TNFRSF10A, TNFRSF10B, TNFRSF10C, TNFRSF10D, TNFRSF11B, TNFRSF12A, TNFRSF14, TNFRSF19, TNFRSF1A, TNFRSF1B, TNFRSF21, TNFRSF25, CD40, FAS, TNFRSF6B, CD27, TNFRSF9, TNFSF10, TNFSF14, TNFSF18, CD40LG, FASLG, CD70, TNFSF8, TNFSF9, TP53, TP53BP2, TP73, TP63, TRADD, TRAF1, TRAF2, TRAF3, TRAF4 и TRAF5.

Применимые трансгенные продукты также включают микроРНК. МикроРНК и другие малые интерферирующие нуклеиновые кислоты регулируют экспрессию генов посредством расщепления/деградации транскрипта целевой РНК или подавления трансляции целевой матричной РНК (мРНК). МикроРНК экспрессируются нативно, как правило, в виде конечных 19-25 нетранслируемых продуктов РНК. МикроРНК проявляют свою активность посредством специфичных для последовательности взаимодействий с 3'-нетранслируемыми областями (UTR) мРНК-мишеней. Эти эндогенно экспрессируемые микроРНК образуют шпильки-предшественники, которые впоследствии процессируются в дуплекс микроРНК, а затем в «зрелую» одноцепочечную молекулу микроРНК. Эта зрелая микроРНК направляет мультибелковый комплекс miRISC, который идентифицирует сайт-мишень, например, в областях 3' UTR, мРНК-мишеней на основе их комплементарности зрелой микроРНК.

Следующий неограничивающий список генов микроРНК и их гомологов используется в некоторых вариантах воплощения способов в качестве трансгенов или в качестве мишеней для малых интерферирующих нуклеиновых кислот, кодируемых трансгенами (например, губки-микроРНК, антисмысловые олигонуклеотиды, TuD РНК): hsa-let-7a, hsa-let-7a\*, hsa-let-7b, hsa-let-7b\*, hsa-let-7c, hsa-let-7c\*, hsa-let-7d, hsa-let-7d\*, hsa-let-7e, hsa-let-7e\*, hsa-let-7f, hsa-let-7f-1\*, hsa-let-7f-2\*, hsa-let-7g, hsa-let-7g\*, hsa-let-71, hsa-let-71\*, hsa-miR-1, hsa-miR-100, hsa-miR-100\*, hsa-miR-101, hsa-miR-101\*, hsa-miR-

103, hsa-miR-105, hsa-miR-105\*, hsa-miR-106a, hsa-miR-106a\*, hsa-miR-106b, hsa-miR-106b\*, hsa-miR-107, hsa-miR-10a, hsa-miR-10a\*, hsa-miR-10b, hsa-miR-10b\*, hsa-miR-1178, hsa-miR-1179, hsa-miR-1180, hsa-miR-1181, hsa-miR-1182, hsa-miR-1183, hsa-miR-1184, hsa-miR-1185, hsa-miR-1197, hsa-miR-1200, hsa-miR-1201, hsa-miR-1202, hsa-miR-1203, hsa-miR-1204, hsa-miR-1205, hsa-miR-1206, hsa-miR-1207-3p, hsa-miR-1207-5p, hsa-miR-1208, hsa-miR-122, hsa-miR-122\*, hsa-miR-1224-3p, hsa-miR-1224-5p, hsa-miR-1225-3p, hsa-miR-1225-5p, hsa-miR-1226, hsa-miR-1226\*, hsa-miR-1227, hsa-miR-1228, hsa-miR-1228\*, hsa-miR-1229, hsa-miR-1231, hsa-miR-1233, hsa-miR-1234, hsa-miR-1236, hsa-miR-1237, hsa-miR-1238, hsa-miR-124, hsa-miR-124\*, hsa-miR-1243, hsa-miR-1244, hsa-miR-1245, hsa-miR-1246, hsa-miR-1247, hsa-miR-1248, hsa-miR-1249, hsa-miR-1250, hsa-miR-1251, hsa-miR-1252, hsa-miR-1253, hsa-miR-1254, hsa-miR-1255a, hsa-miR-1255b, hsa-miR-1256, hsa-miR-1257, hsa-miR-1258, hsa-miR-1259, hsa-miR-125a-3p, hsa-miR-125a-5p, hsa-miR-125b, hsa-miR-125b-1\*, hsa-miR-125b-2\*, hsa-miR-126, hsa-miR-126\*, hsa-miR-1260, hsa-miR-1261, hsa-miR-1262, hsa-miR-1263, hsa-miR-1264, hsa-miR-1265, hsa-miR-1266, hsa-miR-1267, hsa-miR-1268, hsa-miR-1269, hsa-miR-1270, hsa-miR-1271, hsa-miR-1272, hsa-miR-1273, hsa-miR-127-3p, hsa-miR-1274a, hsa-miR-1274b, hsa-miR-1275, hsa-miR-127-5p, hsa-miR-1276, hsa-miR-1277, hsa-miR-1278, hsa-miR-1279, hsa-miR-128, hsa-miR-1280, hsa-miR-1281, hsa-miR-1282, hsa-miR-1283, hsa-miR-1284, hsa-miR-1285, hsa-miR-1286, hsa-miR-1287, hsa-miR-1288, hsa-miR-1289, hsa-miR-129\*, hsa-miR-1290, hsa-miR-1291, hsa-miR-1292, hsa-miR-1293, hsa-miR-129-3p, hsa-miR-1294, hsa-miR-1295, hsa-miR-129-5p, hsa-miR-1296, hsa-miR-1297, hsa-miR-1298, hsa-miR-1299, hsa-miR-1300, hsa-miR-1301, hsa-miR-1302, hsa-miR-1303, hsa-miR-1304, hsa-miR-1305, hsa-miR-1306, hsa-miR-1307, hsa-miR-1308, hsa-miR-130a, hsa-miR-130a\*, hsa-miR-130b, hsa-miR-130b\*, hsa-miR-132, hsa-miR-132\*, hsa-miR-1321, hsa-miR-1322, hsa-miR-1323, hsa-miR-1324, hsa-miR-133a, hsa-miR-133b, hsa-miR-134, hsa-miR-135a, hsa-miR-135a\*, hsa-miR-135b, hsa-miR-135b\*, hsa-miR-136, hsa-miR-136\*, hsa-miR-137, hsa-miR-138, hsa-miR-138-1\*, hsa-miR-138-2\*, hsa-miR-139-3p, hsa-miR-139-5p, hsa-miR-140-3p, hsa-miR-140-5p, hsa-miR-141, hsa-miR-141\*, hsa-miR-142-3p, hsa-miR-142-5p, hsa-miR-143, hsa-miR-143\*, hsa-miR-144, hsa-miR-144\*, hsa-miR-145, hsa-miR-145\*, hsa-miR-146a, hsa-miR-146a\*, hsa-miR-146b-3p, hsa-miR-146b-5p, hsa-miR-147, hsa-miR-147b, hsa-miR-148a, hsa-miR-148a\*, hsa-miR-148b, hsa-miR-148b\*, hsa-miR-149, hsa-miR-149\*, hsa-miR-150, hsa-miR-150\*, hsa-miR-151-3p, hsa-miR-151-5p, hsa-miR-152, hsa-miR-153, hsa-miR-154, hsa-miR-154\*, hsa-miR-155, hsa-miR-155\*, hsa-miR-15a, hsa-miR-15a\*, hsa-miR-15b, hsa-miR-15b\*, hsa-miR-16, hsa-miR-16-1\*, hsa-miR-16-2\*, hsa-miR-17, hsa-miR-17\*, hsa-miR-181a, hsa-miR-181a\*, hsa-miR-181a-2\*, hsa-miR-181b, hsa-miR-181c, hsa-miR-181c\*, hsa-miR-181d, hsa-miR-182, hsa-miR-182\*, hsa-miR-1825, hsa-miR-1826, hsa-miR-1827, hsa-miR-183, hsa-miR-183\*, hsa-miR-184, hsa-miR-185, hsa-miR-185\*, hsa-miR-186, hsa-miR-186\*, hsa-miR-187, hsa-miR-187\*, hsa-miR-188-3p, hsa-miR-188-5p, hsa-miR-18a, hsa-miR-18a\*, hsa-miR-18b, hsa-miR-18b\*, hsa-miR-190, hsa-miR-190b, hsa-miR-191, hsa-miR-191\*, hsa-miR-192, hsa-miR-192\*, hsa-miR-193a-3p, hsa-miR-193a-5p, hsa-miR-193b, hsa-miR-193b\*, hsa-miR-194, hsa-miR-194\*, hsa-miR-195, hsa-miR-195\*, hsa-

miR-196a, hsa-miR-196a\*, hsa-miR-196b, hsa-miR-197, hsa-miR-198, hsa-miR-199a-3p, hsa-miR-199a-5p, hsa-miR-199b-5p, hsa-miR-19a, hsa-miR-19a\*, hsa-miR-19b, hsa-miR-19b-1\*, hsa-miR-19b-2\*, hsa-miR-200a, hsa-miR-200a\*, hsa-miR-200b, hsa-miR-200b\*, hsa-miR-200c, hsa-miR-200c\*, hsa-miR-202, hsa-miR-202\*, hsa-miR-203, hsa-miR-204, hsa-miR-205, hsa-miR-206, hsa-miR-208a, hsa-miR-208b, hsa-miR-20a, hsa-miR-20a\*, hsa-miR-20b, hsa-miR-20b\*, hsa-miR-21, hsa-miR-21\*, hsa-miR-210, hsa-miR-211, hsa-miR-212, hsa-miR-214, hsa-miR-214\*, hsa-miR-215, hsa-miR-216a, hsa-miR-216b, hsa-miR-217, hsa-miR-218, hsa-miR-218-1\*, hsa-miR-218-2\*, hsa-miR-219-1-3p, hsa-miR-219-2-3p, hsa-miR-219-5p, hsa-miR-22, hsa-miR-22\*, hsa-miR-220a, hsa-miR-220b, hsa-miR-220c, hsa-miR-221, hsa-miR-221\*, hsa-miR-222, hsa-miR-222\*, hsa-miR-223, hsa-miR-223\*, hsa-miR-224, hsa-miR-23a, hsa-miR-23a\*, hsa-miR-23b, hsa-miR-23b\*, hsa-miR-24, hsa-miR-24-1\*, hsa-miR-24-2\*, hsa-miR-25, hsa-miR-25\*, hsa-miR-26a, hsa-miR-26a-1\*, hsa-miR-26a-2\*, hsa-miR-26b, hsa-miR-26b\*, hsa-miR-27a, hsa-miR-27a\*, hsa-miR-27b, hsa-miR-27b\*, hsa-miR-28-3p, hsa-miR-28-5p, hsa-miR-296-3p, hsa-miR-296-5p, hsa-miR-297, hsa-miR-298, hsa-miR-299-3p, hsa-miR-299-5p, hsa-miR-29a, hsa-miR-29a\*, hsa-miR-29b, hsa-miR-296-1\*, hsa-miR-296-2\*, hsa-miR-29c, hsa-miR-29c\*, hsa-miR-300, hsa-miR-301a, hsa-miR-301b, hsa-miR-302a, hsa-miR-302a\*, hsa-miR-302b, hsa-miR-302b\*, hsa-miR-302c, hsa-miR-302c\*, hsa-miR-302d, hsa-miR-302d\*, hsa-miR-302e, hsa-miR-302f, hsa-miR-30a, hsa-miR-30a\*, hsa-miR-30b, hsa-miR-30b\*, hsa-miR-30c, hsa-miR-30c-1\*, hsa-miR-30c-2\*, hsa-miR-30d, hsa-miR-30d\*, hsa-miR-30e, hsa-miR-30e\*, hsa-miR-31, hsa-miR-31\*, hsa-miR-32, hsa-miR-32\*, hsa-miR-320a, hsa-miR-320b, hsa-miR-320c, hsa-miR-320d, hsa-miR-323-3p, hsa-miR-323-5p, hsa-miR-324-3p, hsa-miR-324-5p, hsa-miR-325, hsa-miR-326, hsa-miR-328, hsa-miR-329, hsa-miR-330-3p, hsa-miR-330-5p, hsa-miR-331-3p, hsa-miR-331-5p, hsa-miR-335, hsa-miR-335\*, hsa-miR-337-3p, hsa-miR-337-5p, hsa-miR-338-3p, hsa-miR-338-5p, hsa-miR-339-3p, hsa-miR-339-5p, hsa-miR-33a, hsa-miR-33a\*, hsa-miR-33b, hsa-miR-33b\*, hsa-miR-340, hsa-miR-340\*, hsa-miR-342-3p, hsa-miR-342-5p, hsa-miR-345, hsa-miR-346, hsa-miR-34a, hsa-miR-34a\*, hsa-miR-34b, hsa-miR-34b\*, hsa-miR-34c-3p, hsa-miR-34c-5p, hsa-miR-361-3p, hsa-miR-361-5p, hsa-miR-362-3p, hsa-miR-362-5p, hsa-miR-363, hsa-miR-363\*, hsa-miR-365, hsa-miR-367, hsa-miR-367\*, hsa-miR-369-3p, hsa-miR-369-5p, hsa-miR-370, hsa-miR-371-3p, hsa-miR-371-5p, hsa-miR-372, hsa-miR-373, hsa-miR-373\*, hsa-miR-374a, hsa-miR-374a\*, hsa-miR-374b, hsa-miR-374b\*, hsa-miR-375, hsa-miR-376a, hsa-miR-376a\*, hsa-miR-376b, hsa-miR-376c, hsa-miR-377, hsa-miR-377\*, hsa-miR-378, hsa-miR-378\*, hsa-miR-379, hsa-miR-379\*, hsa-miR-380, hsa-miR-380\*, hsa-miR-381, hsa-miR-382, hsa-miR-383, hsa-miR-384, hsa-miR-409-3p, hsa-miR-409-5p, hsa-miR-410, hsa-miR-411, hsa-miR-411\*, hsa-miR-412, hsa-miR-421, hsa-miR-422a, hsa-miR-423-3p, hsa-miR-423-5p, hsa-miR-424, hsa-miR-424\*, hsa-miR-425, hsa-miR-425\*, hsa-miR-429, hsa-miR-431, hsa-miR-431\*, hsa-miR-432, hsa-miR-432\*, hsa-miR-433, hsa-miR-448, hsa-miR-449a, hsa-miR-449b, hsa-miR-450a, hsa-miR-450b-3p, hsa-miR-450b-5p, hsa-miR-451, hsa-miR-452, hsa-miR-452\*, hsa-miR-453, hsa-miR-454, hsa-miR-454\*, hsa-miR-455-3p, hsa-miR-455-5p, hsa-miR-483-3p, hsa-miR-483-5p, hsa-miR-484, hsa-miR-485-3p, hsa-miR-485-5p, hsa-miR-486-3p, hsa-miR-486-5p, hsa-miR-487a, hsa-miR-487b, hsa-miR-488, hsa-

miR-488\*, hsa-miR-489, hsa-miR-490-3p, hsa-miR-490-5p, hsa-miR-491-3p, hsa-miR-491-5p, hsa-miR-492, hsa-miR-493, hsa-miR-493\*, hsa-miR-494, hsa-miR-495, hsa-miR-496, hsa-miR-497, hsa-miR-497\*, hsa-miR-498, hsa-miR-499-3p, hsa-miR-499-5p, hsa-miR-500, hsa-miR-500\*, hsa-miR-501-3p, hsa-miR-501-5p, hsa-miR-502-3p, hsa-miR-502-5p, hsa-miR-503, hsa-miR-504, hsa-miR-505, hsa-miR-505\*, hsa-miR-506, hsa-miR-507, hsa-miR-508-3p, hsa-miR-508-5p, hsa-miR-509-3-5p, hsa-miR-509-3p, hsa-miR-509-5p, hsa-miR-510, hsa-miR-511, hsa-miR-512-3p, hsa-miR-512-5p, hsa-miR-513a-3p, hsa-miR-513a-5p, hsa-miR-513b, hsa-miR-513c, hsa-miR-514, hsa-miR-515-3p, hsa-miR-515-5p, hsa-miR-516a-3p, hsa-miR-516a-5p, hsa-miR-516b, hsa-miR-517\*, hsa-miR-517a, hsa-miR-517b, hsa-miR-517c, hsa-miR-518a-3p, hsa-miR-518a-5p, hsa-miR-518b, hsa-miR-518c, hsa-miR-518c\*, hsa-miR-518d-3p, hsa-miR-518d-5p, hsa-miR-518e, hsa-miR-518e\*, hsa-miR-518f, hsa-miR-518f\*, hsa-miR-519a, hsa-miR-519b-3p, hsa-miR-519c-3p, hsa-miR-519d, hsa-miR-519e, hsa-miR-519e\*, hsa-miR-520a-3p, hsa-miR-520a-5p, hsa-miR-520b, hsa-miR-520c-3p, hsa-miR-520d-3p, hsa-miR-520d-5p, hsa-miR-520e, hsa-miR-520f, hsa-miR-520g, hsa-miR-520h, hsa-miR-521, hsa-miR-522, hsa-miR-523, hsa-miR-524-3p, hsa-miR-524-5p, hsa-miR-525-3p, hsa-miR-525-5p, hsa-miR-526b, hsa-miR-526b\*, hsa-miR-532-3p, hsa-miR-532-5p, hsa-miR-539, hsa-miR-541, hsa-miR-541\*, hsa-miR-542-3p, hsa-miR-542-5p, hsa-miR-543, hsa-miR-544, hsa-miR-545, hsa-miR-545\*, hsa-miR-548a-3p, hsa-miR-548a-5p, hsa-miR-548b-3p, hsa-miR-548b-5p, hsa-miR-548c-3p, hsa-miR-548c-5p, hsa-miR-548d-3p, hsa-miR-548d-5p, hsa-miR-548e, hsa-miR-548f, hsa-miR-548g, hsa-miR-548h, hsa-miR-548i, hsa-miR-548j, hsa-miR-548k, hsa-miR-548l, hsa-miR-548m, hsa-miR-548n, hsa-miR-548o, hsa-miR-548p, hsa-miR-549, hsa-miR-550, hsa-miR-550\*, hsa-miR-551a, hsa-miR-551b, hsa-miR-551b\*, hsa-miR-552, hsa-miR-553, hsa-miR-554, hsa-miR-555, hsa-miR-556-3p, hsa-miR-556-5p, hsa-miR-557, hsa-miR-558, hsa-miR-559, hsa-miR-561, hsa-miR-562, hsa-miR-563, hsa-miR-564, hsa-miR-566, hsa-miR-567, hsa-miR-568, hsa-miR-569, hsa-miR-570, hsa-miR-571, hsa-miR-572, hsa-miR-573, hsa-miR-574-3p, hsa-miR-574-5p, hsa-miR-575, hsa-miR-576-3p, hsa-miR-576-5p, hsa-miR-577, hsa-miR-578, hsa-miR-579, hsa-miR-580, hsa-miR-581, hsa-miR-582-3p, hsa-miR-582-5p, hsa-miR-583, hsa-miR-584, hsa-miR-585, hsa-miR-586, hsa-miR-587, hsa-miR-588, hsa-miR-589, hsa-miR-589\*, hsa-miR-590-3p, hsa-miR-590-5p, hsa-miR-591, hsa-miR-592, hsa-miR-593, hsa-miR-593\*, hsa-miR-595, hsa-miR-596, hsa-miR-597, hsa-miR-598, hsa-miR-599, hsa-miR-600, hsa-miR-601, hsa-miR-602, hsa-miR-603, hsa-miR-604, hsa-miR-605, hsa-miR-606, hsa-miR-607, hsa-miR-608, hsa-miR-609, hsa-miR-610, hsa-miR-611, hsa-miR-612, hsa-miR-613, hsa-miR-614, hsa-miR-615-3p, hsa-miR-615-5p, hsa-miR-616, hsa-miR-616\*, hsa-miR-617, hsa-miR-618, hsa-miR-619, hsa-miR-620, hsa-miR-621, hsa-miR-622, hsa-miR-623, hsa-miR-624, hsa-miR-624\*, hsa-miR-625, hsa-miR-625\*, hsa-miR-626, hsa-miR-627, hsa-miR-628-3p, hsa-miR-628-5p, hsa-miR-629, hsa-miR-629\*, hsa-miR-630, hsa-miR-631, hsa-miR-632, hsa-miR-633, hsa-miR-634, hsa-miR-635, hsa-miR-636, hsa-miR-637, hsa-miR-638, hsa-miR-639, hsa-miR-640, hsa-miR-641, hsa-miR-642, hsa-miR-643, hsa-miR-644, hsa-miR-645, hsa-miR-646, hsa-miR-647, hsa-miR-648, hsa-miR-649, hsa-miR-650, hsa-miR-651, hsa-miR-652, hsa-miR-653, hsa-miR-654-3p, hsa-miR-654-5p, hsa-miR-655, hsa-miR-656, hsa-miR-657, hsa-miR-658, hsa-

miR-659, hsa-miR-660, hsa-miR-661, hsa-miR-662, hsa-miR-663, hsa-miR-663b, hsa-miR-664, hsa-miR-664\*, hsa-miR-665, hsa-miR-668, hsa-miR-671-3p, hsa-miR-671-5p, hsa-miR-675, hsa-miR-7, hsa-miR-708, hsa-miR-708\*, hsa-miR-7-1\*, hsa-miR-7-2\*, hsa-miR-720, hsa-miR-744, hsa-miR-744\*, hsa-miR-758, hsa-miR-760, hsa-miR-765, hsa-miR-766, hsa-miR-767-3p, hsa-miR-767-5p, hsa-miR-768-3p, hsa-miR-768-5p, hsa-miR-769-3p, hsa-miR-769-5p, hsa-miR-770-5p, hsa-miR-802, hsa-miR-873, hsa-miR-874, hsa-miR-875-3p, hsa-miR-875-5p, hsa-miR-876-3p, hsa-miR-876-5p, hsa-miR-877, hsa-miR-877\*, hsa-miR-885-3p, hsa-miR-885-5p, hsa-miR-886-3p, hsa-miR-886-5p, hsa-miR-887, hsa-miR-888, hsa-miR-888\*, hsa-miR-889, hsa-miR-890, hsa-miR-891a, hsa-miR-891b, hsa-miR-892a, hsa-miR-892b, hsa-miR-9, hsa-miR-9\*, hsa-miR-920, hsa-miR-921, hsa-miR-922, hsa-miR-923, hsa-miR-924, hsa-miR-92a, hsa-miR-92a-1\*, hsa-miR-92a-2\*, hsa-miR-92b, hsa-miR-92b\*, hsa-miR-93, hsa-miR-93\*, hsa-miR-933, hsa-miR-934, hsa-miR-935, hsa-miR-936, hsa-miR-937, hsa-miR-938, hsa-miR-939, hsa-miR-940, hsa-miR-941, hsa-miR-942, hsa-miR-943, hsa-miR-944, hsa-miR-95, hsa-miR-96, hsa-miR-96\*, hsa-miR-98, hsa-miR-99a, hsa-miR-99a\*, hsa-miR-99b и hsa-miR-99b\*. Например, может представлять интерес микроРНК, нацеленная на 72 открытую рамку считывания хромосомы 8 (C9orf72), которая экспрессирует супероксиддисмутазу (SOD1), связанную с боковым амиотрофическим склерозом (ALS).

МикроРНК подавляет функцию мРНК, на которую она нацелена, и в результате подавляет экспрессию полипептидов, кодируемых этими мРНК. Таким образом, блокирование (частично или полностью) активности микроРНК (например, подавление микроРНК) может эффективно индуцировать или восстанавливать экспрессию полипептида, экспрессия которого ингибируется (подавление полипептида). В одном из вариантов воплощения дерепрессия полипептидов, кодируемых мРНК-мишенями микроРНК, достигается путем ингибирования активности микроРНК в клетках с помощью любого из множества способов. Например, блокирование активности микроРНК может быть достигнуто путем гибридизации с малой интерферирующей нуклеиновой кислотой (например, антисмысловым олигонуклеотидом, губкой-микроРНК, TuD-РНК), которая комплементарна или практически комплементарна микроРНК, тем самым блокируя взаимодействие микроРНК со своей целевой мРНК. В контексте данного документа, малая интерферирующая нуклеиновая кислота, которая практически комплементарна микроРНК, представляет собой ту, которая способна гибридизоваться с микроРНК и блокировать активность микроРНК. В некоторых вариантах воплощения малая интерферирующая нуклеиновая кислота, которая практически комплементарна микроРНК, представляет собой малую интерферирующую нуклеиновую кислоту, которая комплементарна для микроРНК всем основаниям, кроме 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 или 18. «Ингибитор микроРНК» представляет собой агент, который блокирует функцию, экспрессию и/или процессинг микроРНК. Например, эти молекулы включают, но не ограничиваются ими, специфические антисмысловые микроРНК, губки-микроРНК, жесткие РНК-ловушки (TuD РНК) и олигонуклеотиды микроРНК (двухцепочечные, шпильки, короткие олигонуклеотиды), которые ингибируют

взаимодействие микроРНК с комплексом Дроша.

Другие применимые трансгены могут включать те, которые кодируют иммуноглобулины, которые придают пассивный иммунитет к патогену. «Молекула иммуноглобулина» представляет собой белок, содержащий иммунологически активные части тяжелой цепи иммуноглобулина и легкой цепи иммуноглобулина, ковалентно связанные вместе и способные специфически соединяться с антигеном. Молекулы иммуноглобулинов относятся к любому типу (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY), классу (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или подклассу. Термины «антитело» и «иммуноглобулин» могут использоваться в данном документе взаимозаменяемо.

«Тяжелая цепь иммуноглобулина» представляет собой полипептид, который содержит по меньшей мере часть антигенсвязывающего домена иммуноглобулина и по меньшей мере часть вариабельной области тяжелой цепи иммуноглобулина или по меньшей мере часть константной области тяжелой цепи иммуноглобулина. Таким образом, тяжелая цепь, полученная из иммуноглобулина, имеет значительные области гомологии аминокислотной последовательности с членом суперсемейства генов иммуноглобулинов. Например, тяжелая цепь в Fab-фрагменте представляет собой тяжелую цепь, полученную из иммуноглобулина. «Легкая цепь иммуноглобулина» представляет собой полипептид, который содержит по меньшей мере часть антигенсвязывающего домена иммуноглобулина и по меньшей мере часть вариабельной области или по меньшей мере часть константной области легкой цепи иммуноглобулина. Таким образом, полученная из иммуноглобулина легкая цепь имеет значительные области аминокислотной гомологии с членом суперсемейства генов иммуноглобулинов. «Иммуноадгезин» представляет собой химерную, подобную антителу молекулу, которая объединяет функциональный домен связывающего белка, обычно рецептора, лиганда или молекулы клеточной адгезии, с константными доменами иммуноглобулина, обычно включая шарнирные и Fc-области.

«Фрагмент, связывающий антиген» (Fab) представляет собой область антитела, которая связывается с антигенами. Он состоит из одного константного и одного вариабельного домена как тяжелой, так и легкой цепи.

Конструкция против патогена выбирается на основе возбудителя (патогена) заболевания, от которого требуется защита. Эти патогены могут быть вирусного, бактериального или грибкового происхождения и могут использоваться для предотвращения заражения людей болезнями человека, или у других млекопитающих или других животных для предотвращения ветеринарных заболеваний.

rAAV может включать гены, кодирующие антитела и, в частности, нейтрализующие антитела против вирусного патогена. Такие противовирусные антитела могут включать антитела против гриппа, направленные против одного или более из гриппа А, гриппа В и гриппа С. Вирусы типа А являются наиболее вирулентными патогенами человека. Серотипы гриппа А, которые были связаны с пандемиями,

включают H1N1, который вызвал испанский грипп в 1918 году, и свиной грипп в 2009 году; H2N2, вызвавший азиатский грипп в 1957 году; H3N2, вызвавший Гонконгский грипп в 1968 году; H5N1, вызвавший птичий грипп в 2004 году; H7N7; H1N2; H9N2; H7N2; H7N3; и H10N7. Другие патогенные вирусы-мишени включают аренавирусы (включая фуниин, мачупо и Ласса), филовирусы (включая Марбург и лихорадку Эбола), хантавирусы, пикорновирусы (включая риновирусы, эховирусы), коронавирусы, парамиксовирус, морбилливирус, респираторно-синтевирусный вирус, тогавирус, вирус Коксаки, вирус Джона Каннингема, парвовирус B19, парагрипп, аденовирусы, реовирусы, натуральную оспу (*Variola major* (натуральная оспа)) и оспу (оспа) из семейства поксвирусов и ветрянную оспу (псевдобешенство). Вирусные геморрагические лихорадки вызываются представителями семейства аренавирусов (лихорадка Ласса) (это семейство также связано с лимфоцитарным хориоменингитом (LCM)), филовирусом (вирус Эбола) и хантавирусом (пурумала). Члены пикорнавируса (подсемейство риновирусов) связаны с простудой у человека. Семейство коронавирусов, которое включает ряд не относящихся к человеку вирусов, таких как вирус инфекционного бронхита (домашняя птица), трансмиссивный вирус желудочно-кишечного тракта свиней (свинья), вирус гемагглютинаинового энцефаломиелита свиней (свинья), вирус инфекционного перитонита кошек (кошка), энтерический коронавирус кошек (кошка), собачий коронавирус (собака). Респираторные коронавирусы человека предположительно были связаны с простудой, гепатитом А, В или С и внезапным острым респираторным синдромом (SARS). Семейство парамиксовирусов включает вирус парагриппа типа 1, вирус парагриппа типа 3, вирус парагриппа крупного рогатого скота типа 3, рубулавирус (вирус паротита, вирус парагриппа типа 2, вирус парагриппа типа 4, вирус болезни Ньюкасла (цыплята), чуму крупного рогатого скота, морбилливирус, который включает корь и чумку собак, и пневмовирус, который включает респираторно-синцитиальный вирус (RSV). Семейство парвовирусов включает парвовирус кошек (энтерит кошек), вирус панлейкопении кошек, парвовирус собак и парвовирус свиней. Семейство аденовирусов включает вирусы (EX, AD7, ARD, O.B.), вызывающие респираторные заболевания. Таким образом, в некоторых вариантах воплощения вектор gAAV, как описано в настоящем документе, может быть сконструирован для экспрессии антитела против вируса Эбола, например, 2G4, 4G7, 13C6, антитела против гриппа, например FI6, CR8033, и антитела против RSV, например, паливизумаб, мотавизумаб. Конструкция нейтрализующего антитела против бактериального патогена также может быть выбрана для использования в настоящем изобретении. В одном из вариантов воплощения конструкция нейтрализующего антитела направлена против самих бактерий. В другом варианте воплощения конструкция нейтрализующего антитела направлена против токсина, продуцируемого бактериями. Примеры переносимых по воздуху бактериальных патогенов включают, например, *Neisseria meningitidis* (менингит), *Klebsiella pneumonia* (пневмония), *Pseudomonas aeruginosa* (пневмония), *Pseudomonas pseudomallei* (пневмония), *Pseudomonas mallei* (пневмония), *Acinetobacter* (пневмония), *Moraxella*

catarrhalis, *Moraxella lacunata*, *Alkaligenes*, *Cardiobacterium*, *Haemophilus influenzae* (грипп), *Haemophilus parainfluenzae*, *Bordetella pertussis* (коклюш), *Francisella tularensis* (пневмония/лихорадка), *Legionella pneumonia* (Legionnaires disease), *Chlamydia psittaci* (пневмония), *Chlamydia pneumoniae* (пневмония), *Mycobacterium tuberculosis* (туберкулез (ТБ)), *Mycobacterium kansasii* (ТБ), *Mycobacterium avium* (пневмония), *Nocardia asteroides* (пневмония), *Bacillus anthracis* (сибирская язва), *Staphylococcus aureus* (пневмония), *Streptococcus pyogenes* (скарлатина), *Streptococcus pneumoniae* (пневмония), *Corynebacteria diphtheria* (дифтерия), *Mycoplasma pneumoniae* (пневмония).

гAAV может включать гены, кодирующие антитела, и, в частности, нейтрализующие антитела против бактериального патогена, такого как возбудитель сибирской язвы, токсин, продуцируемый *Bacillus anthracis*. Были описаны нейтрализующие антитела против защитного агента (РА), одного из трех пептидов, образующих анатоксин. Два других полипептида состоят из летального фактора (LF) и фактора отека (EF). Нейтрализующие антитела против РА были описаны как эффективные при пассивной иммунизации против сибирской язвы. См., например, патент США № 7 442 373; R. Sawada-Hirai et al, J Immune Based Ther Vaccines. 2004; 2: 5. (онлайн, 12 мая 2004 года). Были описаны и/или могут быть получены другие нейтрализующие токсин антитела против сибирской язвы. Аналогичным образом, нейтрализующие антитела против других бактерий и/или бактериальных токсинов могут быть использованы для создания доставляемой AAV конструкции против патогена, как описано в данном документе.

Антитела против инфекционных заболеваний могут быть вызваны паразитами или грибами, включая, например, виды *Aspergillus*, *Absidia corymbifera*, *Rhizopus stolonifer*, *Mucor plumbeus*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Penicillium species*, *Micropolyspora faeni*, *Thermoactinomyces vulgaris*, *Alternaria alternate*, виды *Cladosporium*, *Helminthosporium* и виды *Stachybotrys*.

гAAV может включать гены, кодирующие антитела и, в частности, нейтрализующие антитела, против патогенных факторов таких заболеваний, как болезнь Альцгеймера (AD), болезнь Паркинсона (PD), GBA-ассоциированная болезнь Паркинсона (GBA-PD), ревматоидный артрит (RA), Синдром раздраженного кишечника (IBS), хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ), рак, опухоли, системный склероз, астма и другие заболевания. Такими антителами могут быть, без ограничения, например, альфа-синуклеин, фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) (анти-VEGF), анти-VEGFA, анти-PD-1, анти-PDL1, анти-CTLA-4, анти-TNF-альфа, анти-IL-17, анти-IL-23, анти-IL-21, анти-IL-6, анти-IL-6 рецептор, анти-IL-5, анти-IL-7, анти-фактор XII, анти-IL-2, анти-HIV, анти-IgE, рецептор фактора некроза опухоли-1 (TNFR1), анти-Notch 2/3, anti-notch 1, anti-OX40, anti-erb-b2 рецептор тирозинкиназы 3 (ErbB3), анти-ErbB2, антиген созревания бета-клеток, анти-B-стимулятор лимфоцитов, анти-CD20, анти-HER2, анти-гранулоцитарный колониестимулирующий фактор макрофагов, анти-онкостатин М (OSM), анти-белок гена активации лимфоцитов 3 (LAG3), анти-CCL20, антисывороточный компонент амилоида Р (SAP), антипролилгидроксилазный ингибитор,

анти-CD38, антигликопротеин Пб/Ша, анти-CD52, анти-CD30, анти-IL-1beta, рецептор противоэпидермального фактора роста, анти-CD25, анти-RANK лиганд, анти-белок C5 системы комплемента, анти-CD11a, анти-CD3 рецептор, анти-альфа-4 ( $\alpha 4$ ) интегрин, анти-RSV белок F и антиинтегрин  $\alpha 4\beta 7$ . Тем не менее, специалисту в данной области техники будут очевидны другие патогены и заболевания. Другие подходящие антитела могут включать те, которые можно использовать для лечения болезни Альцгеймера, такие как, например, анти-бета-амилоид (например, кренезумаб, соланезумаб, адуканумаб), анти-бета-амилоидные фибриллы, анти-бета-амилоидные бляшки, антитела против тау, бапинеузаумаб и другие. Другие подходящие антитела для лечения различных показаний включают антитела, описанные, например, в PCT/US2016/058968, поданной 27 октября 2016 г., опубликованной как WO 2017/075119A1.

## II. Получение вектора rAAV

Для использования при получении вирусного вектора AAV (например, рекомбинантного (r) AAV) кассеты экспрессии могут быть перенесены в любой подходящий вектор, например плазмиду, которая доставляется в упаковывающую клетку-хозяина. Плазмиды, используемые в данном изобретении, могут быть сконструированы таким образом, чтобы они были пригодны для репликации и упаковки *in vitro* в прокариотических клетках, клетках насекомых, клетках млекопитающих, среди прочего. Подходящие методы трансфекции и упаковки клеток хозяев известны и/или могут быть легко разработаны специалистом в данной области техники.

Способы создания и выделения AAV, подходящих для использования в качестве векторов, известны в данной области техники. См., в общем, например, Grieger & Samulski, 2005, "Adeno-associated 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, каждая из которых полностью включена в настоящий документ посредством ссылки. Для упаковки трансгена в вирионы ITR являются единственными компонентами AAV, необходимыми в цис-системе в той же конструкции, что и молекула нуклеиновой кислоты, содержащая кассеты экспрессии. Гены капсидов и и повтора могут поставляться в *транс* конфигурации.

В одном из вариантов воплощения, описанные в данном документе кассеты экспрессии сконструированы в генетический элемент (например, челночную плазмиду), который переносит последовательности конструкции трансгена, переносимые на ней, в упаковывающую клетку-хозяин для получения вирусного вектора. В одном из вариантов воплощения, выбранный генетический элемент может быть доставлен в упаковочную клетку AAV любым подходящим способом, включая трансфекцию, электропорацию, доставку липосомами, методы слияния мембран, высокоскоростные гранулы, покрытые ДНК, вирусную инфекцию и слияние протопластов. Также могут быть созданы клетки, стабильно упаковывающие AAV. Альтернативно, кассеты экспрессии можно использовать для создания вирусного вектора, отличного от AAV. Способы, используемые для создания

таких конструкций, известны специалистам в области манипуляций с нуклеиновыми кислотами и включают генную инженерию, рекомбинантную инженерию и синтетические методы. См., например, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, ed. Green and Sambrook, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (2012).

Термин «промежуточный AAV» или «промежуточный вектор AAV» относится к собранному капсиду rAAV, в котором отсутствуют желаемые геномные последовательности, упакованные в него. Их также можно называть «пустыми» капсидами. Такой капсид может не содержать поддающихся обнаружению геномных последовательностей кассеты экспрессии или только частично упакованных геномных последовательностей, которых недостаточно для достижения экспрессии генного продукта. Эти пустые капсиды не могут передавать интересующий ген клетке-хозяину.

Представленный в данном документе рекомбинантный аденоассоциированный вирус (AAV) может быть получен с использованием известных методик. См., например, WO 2003/042397; WO 2005/033321, WO 2006/110689; США 7588772 B2. Такой способ включает культивирование клетки-хозяина, которая содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую капсидный белок AAV; функциональный ген повтора; кассету экспрессии, состоящую, как минимум, из инвертированных концевых повторов AAV (ITR) и трансгена; и достаточные вспомогательные функции, позволяющие упаковывать кассету экспрессии в капсидный белок AAV. Были описаны способы получения капсида, его кодирующих последовательностей и способы получения вирусных векторов rAAV. См., например, Gao, et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100 (10), 6081-6086 (2003) и США 2013/0045186A1.

В одном из вариантов воплощения предоставлена культура клеток-продуцентов, пригодная для получения рекомбинантного AAV. Такая клеточная культура содержит нуклеиновую кислоту, которая экспрессирует капсидный белок AAV в клетке-хозяине; молекулу нуклеиновой кислоты, подходящую для упаковки в капсид AAV, например векторный геном, который содержит ITR AAV и последовательность нуклеиновой кислоты, не являющуюся AAV, кодирующую продукт гена, функционально связанный с последовательностями, которые направляют экспрессию продукта в клетке-хозяине; и достаточные репродуктивные функции AAV и вспомогательные функции аденовируса, позволяющие упаковывать молекулу нуклеиновой кислоты в рекомбинантный капсид AAV. В одном из вариантов воплощения клеточная культура состоит из клеток млекопитающих (например, эмбриональных клеток 293 почки человека, среди прочего) или клеток насекомых (например, бакуловируса).

Необязательно функции повтора обеспечиваются AAV, отличным от AAV, обеспечивающего капсид. Например, повтора может быть, без ограничения, белком повтора AAV1, белком повтора AAV2, белком повтора AAV3, белком повтора AAV4, белком повтора AAV5, белком повтора AAV6, белком повтора AAV7, белком повтора AAV8; или повтора 78, повтора 68, повтора 52, повтора 40, повтора 68/78 и повтора 40/52; или его фрагментом; или другим источником. Необязательно, последовательности и сар

находятся на одном и том же генетическом элементе в культуре клеток. Между последовательностью повтора и геном капсида может быть спейсер. Любая из этих последовательностей капсида AAV или мутантного AAV может находиться под контролем экзогенных регуляторных контрольных последовательностей, которые направляют их экспрессию в клетке-хозяине.

В одном из вариантов воплощения клетки получают в подходящей культуре клеток (например, НЕК 293). Способы производства векторов для генной терапии, описанные в данном документе, включают способы, хорошо известные в данной области техники, такие как создание плазмидной ДНК, используемой для получения векторов для генной терапии, создание векторов и очистка векторов. В некоторых вариантах воплощения вектор для генной терапии представляет собой вектор AAV, а полученные плазмиды представляют собой цис-плазмиду AAV, кодирующую геном вектора, включая ген интереса, транс-плазмиду AAV, содержащую гены повтора и капсида AAV, и вспомогательную плазмиду аденовируса. Процесс создания вектора может включать этапы способа, такие как инициирование клеточной культуры, пассаж клеток, посев клеток, трансфекция клеток плазмидной ДНК, замена посттрансфекционной среды на бессывороточную среду и сбор вектор-содержащих клеток и культуральной среды. Собранные клетки, содержащие вектор, и культуральные среды упоминаются в данном документе как сбор неочищенных клеток. В еще одной системе векторы для генной терапии вводят в клетки насекомых путем инфицирования векторами на основе бакуловирусов. Для обзоров этих производственных систем см. в целом, например, Zhang et al., 2009, «Adenovirus-Adeno-associated virus hybrid for large-scale recombinant Adeno-associated virus production», Human Gene Therapy 20:922-929, содержание каждой из которых полностью включено в настоящий документ посредством ссылки. Способы изготовления и использования этих и других систем получения AAV также описаны в следующих патентах США, содержание каждого из которых полностью включено в настоящий документ посредством ссылки: 5139941; 5741683; 6057152; 6204059; 6268213; 6491907; 6660514; 6951753; 7094604; 7172893; 7201898; 7229823; и 7439065.

После этого сбор неочищенных клеток может быть субъектом таких стадий способа, как концентрирование собранного вектора, диафильтрация собранного вектора, микрофлюидизация собранного вектора, расщепление нуклеазами собранного вектора, фильтрация микрофлюидизированного промежуточного продукта, грубая очистка хроматографией, грубая очистка ультрацентрифугированием, замена буфера путем фильтрации в тангенциальном потоке и/или составление и фильтрация для приготовления основного вектора.

Двухступенчатая очистка с помощью аффинной хроматографии при высокой концентрации соли с последующей хроматографией на анионообменной смоле используется для очистки векторного лекарственного продукта и удаления пустых капсидов. Эти способы описаны более детально в публикации международного патента № WO 2017/160360, которая включена в настоящий документ посредством ссылки. Способы

очистки для AAV8 в публикации № WO2017/100676 и rh10, в международной патентной публикации № WO 2017/100704, и для AAV1, международной патентной публикации № WO 2017/100674, все включены в данном документе в качестве ссылки.

Для расчета содержания пустых и полных частиц объема полос VP3 для выбранного образца (например, в приведенных в данном документе примерах, препарат, очищенный градиентом йодиксанола, где количество GC=количество частиц) наносят на график относительно загруженных частиц GC. Полученное линейное уравнение ( $y=mx+c$ ) используется для вычисления количества частиц в объемах полос пиков испытуемого вещества. Затем количество частиц (кч) на загруженные 20 мкл умножают на 50, чтобы получить количество частиц (кч)/мл. Кч/мл, разделенное на GC/мл, дает отношение частиц к копиям генома (кч/GC). Кч/мл - GC/мл дает кч/мл пустых. Кч/мл пустых, деленное на кч/мл, и умноженное на 100 дает процент пустых частиц.

В принципе, в данной области техники известны способы анализа пустых капсидов и векторных частиц AAV с упакованными геномами. См., например, Grimm et al., *Gene Therapy* (1999) 6:1322-1330; Sommer et al., *Molec. Ther.* (2003) 7:122-128. Для тестирования денатурированного капсида способы включают подвергание обработанного исходного материала AAV электрофорезу в SDS-полиакриламидном геле, состоящем из любого геля, способного разделять три капсидных белка, например градиентного геля, содержащего 3-8% трис-ацетата в буфере, затем прогон геля до тех пор, пока материал образца не отделится, и нанесение геля на нейлоновые или нитроцеллюлозные мембраны, предпочтительно нейлон. Затем используют антитела против капсида AAV в качестве первичных антител, которые связываются с денатурированными белками капсида, предпочтительно моноклональное антитело против капсида AAV, наиболее предпочтительно моноклональное антитело против AAV-2 B1 (Wobus et al., *J. Virol.* (2000) 74:9281-9293). Затем используется вторичное антитело, которое связывается с первичным антителом и содержит средство для обнаружения связывания с первичным антителом, более предпочтительно анти-IgG-антитело, содержащее детектирующую молекулу, ковалентно связанную с ним, наиболее предпочтительно овечье антимышиное IgG антитело, ковалентно связанное с пероксидазой хрена. Способ обнаружения связывания используется для полуколичественного определения связывания между первичными и вторичными антителами, предпочтительно способ обнаружения, способный обнаруживать излучение радиоактивных изотопов, электромагнитное излучение или колориметрические изменения, наиболее предпочтительно набор для обнаружения хемилюминесценции. Например, для SDS-PAGE образцы из фракций колонки могут быть взяты и нагреты в загрузочном буфере SDS-PAGE, содержащем восстанавливающий агент (например, DTT), а капсидные белки разделяются на предварительно отлитых градиентных полиакриламидных гелях (например, Novex). Окрашивание серебром можно проводить с помощью SilverXpress (Invitrogen, CA) в соответствии с инструкциями производителя или другим подходящим способом окрашивания, например красителями SYPRO на рубин или кумасси. В одном из вариантов воплощения концентрацию геномов вектора AAV (vg) во

фракциях колонки можно измерить с помощью количественной ПЦР в реальном времени (Q-PCR). Образцы разбавляют и переваривают ДНКазой I (или другой подходящей нуклеазой) для удаления экзогенной ДНК. После инактивации нуклеазы образцы дополнительно разбавляют и амплифицируют с использованием праймеров и флуорогенного зонда TaqMan™, специфичного для последовательности ДНК между праймерами. Количество циклов, необходимых для достижения определенного уровня флуоресценции (пороговый цикл, Ct), измеряется для каждого образца с помощью системы обнаружения последовательностей Applied Biosystems Prism 7700. Плазмидную ДНК, содержащую последовательности, идентичные последовательности, содержащейся в векторе AAV, используют для построения стандартной кривой в реакции Q-PCR. Значения порогового цикла (Ct), полученные из образцов, используются для определения титра генома вектора путем его нормализации до значения Ct стандартной кривой плазмиды. Также можно использовать анализы конечных точек, основанные на цифровой ПЦР.

В одном аспекте используется оптимизированный способ q-PCR, который использует сериновую протеазу широкого спектра действия, например протеиназу К (например, коммерчески доступную от Qiagen). В частности, оптимизированный анализ титра генома кПЦР аналогичен стандартному анализу, за исключением того, что после расщепления ДНКазой I образцы разбавляют буфером протеиназы К и обрабатывают протеиназой К с последующей тепловой инактивацией. Подходящим образом образцы разбавляют буфером протеиназы К в количестве, равном размеру образца. Буфер протеиназы К может быть сконцентрирован в 2 раза или выше. Обычно обработка протеиназой К составляет приблизительно 0,2 мг/мл, но может варьировать от 0,1 мг/мл до приблизительно 1 мг/мл. Стадия обработки обычно проводится при температуре приблизительно 55°C в течение приблизительно 15 минут, но может выполняться при более низкой температуре (например, от приблизительно 37°C до приблизительно 50°C) в течение более длительного периода времени (например, от приблизительно 20 минут до приблизительно 30 минут) или более высокой температуре (например, приблизительно до 60°C) в течение более короткого периода времени (например, приблизительно от 5 до 10 минут). Точно так же тепловая инактивация обычно происходит при приблизительно 95°C в течение приблизительно 15 минут, но температуру можно снизить (например, от приблизительно 70 до приблизительно 90°C) и увеличить время (например, от приблизительно 20 минут до приблизительно 30 минут). Затем образцы разбавляют (например, в 1000 раз) и подвергают анализу TaqMan, как описано в стандартном анализе.

Дополнительно или в качестве альтернативы можно использовать капельную цифровую ПЦР (ddPCR). Например, были описаны способы определения титров одноцепочечного и самокомплементарного генома вектора AAV с помощью ddPCR. См., например, M. Lock et al, Hum Gene Ther Methods. 2014 Apr;25(2):115-25. doi: 10.1089/hgtb.2013.131. Epub 2014 Feb 14.

Вкратце, способ отделения частиц rAAV, имеющих упакованные геномные

последовательности, от не имеющих геном промежуточных AAV включает подвергание суспензии, содержащей рекомбинантные вирусные частицы AAV и промежуточные капсиды AAV, быстрой жидкостной хроматографии, в которой вирусные частицы AAV и промежуточные AAV связываются с сильной анионообменной смолой, уравновешенной при высоком pH, и подвергаются солевого градиенту, при мониторинге элюата на предмет поглощения ультрафиолетового излучения при приблизительно 260 и приблизительно 280. pH можно регулировать в зависимости от выбранного AAV. См., например, WO2017/160360 (AAV9), WO2017/100704 (AAVrh10), WO 2017/100676 (например, AAV8) и WO 2017/100674 (AAV1)], которые включены в настоящий документ посредством ссылки. В этом способе полные капсиды AAV собираются из фракции, которая элюируется, когда соотношение A260/A280 достигает точки перегиба. В одном примере для стадии аффинной хроматографии диафильтрованный продукт можно наносить на аффинную смолу Capture Select™ Poros-AAV2/9 (Life Technologies), которая эффективно захватывает серотип AAV2. В этих ионных условиях значительный процент остаточной клеточной ДНК и белков проходит через колонку, в то время как частицы AAV эффективно захватываются.

### III. Композиции и Применение

В настоящем документе представлены композиции, содержащие по меньшей мере один стоковый rAAV (например, стоковый rAAV или стоковый мутантный rAAV) и необязательный носитель, наполнитель и/или консервант. Стоковый rAAV относится к множеству одинаковых векторов rAAV, например, в количествах, описанных ниже при обсуждении концентраций и единиц дозировки.

В контексте данного документа, термин «носитель» включает любой и все растворители, дисперсионные среды, носители, покрытия, разбавители, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические агенты и агенты, замедляющие абсорбцию, буферы, растворы носителей, суспензии, коллоиды и т.п. Использование таких сред и агентов для фармацевтических активных веществ хорошо известно в данной области техники. В композиции также могут быть включены дополнительные активные ингредиенты. Фраза «фармацевтически приемлемый» относится к молекулярным объектам и композициям, которые не вызывают аллергической или подобной нежелательной реакции при введении организму-хозяину. Носители для доставки, такие как липосомы, нанокапсулы, микрочастицы, микросферы, липидные частицы, везикулы и т.п., могут использоваться для введения композиций по настоящему изобретению в подходящие клетки-хозяева. В частности, трансгены, доставляемые вектором rAAV, могут быть составлены для доставки либо инкапсулированными в липидную частицу, липосому, везикулу, наносферу, либо наночастицу или тому подобное.

В одном из вариантов воплощения композиция включает конечный состав, подходящий для доставки субъекту, например, представляет собой водную жидкую суспензию, забуференную до физиологически совместимого pH и концентрации соли. Необязательно, в составе присутствует одно или более поверхностно-активных веществ. В

другом варианте воплощения композиция может транспортироваться в виде концентрата, который разбавляют для введения субъекту. В других вариантах воплощения композиция может быть лиофилизирована и восстановлена во время введения.

Подходящее поверхностно-активное вещество или комбинация поверхностно-активных веществ может быть выбрана из неионогенных поверхностно-активных веществ, которые не токсичны. В одном из вариантов воплощения выбирают дифункциональное блок-сополимерное поверхностно-активное вещество с концевыми первичными гидроксильными группами, например, такое как Pluronic® F68 [BASF], также известное как Poloxamer 188, который имеет нейтральный pH, имеет среднюю молекулярную массу 8400. Могут быть выбраны другие поверхностно-активные вещества и другие полуксамеры, то есть неионные триблочные сополимеры, состоящие из центральной гидрофобной цепи полиоксипропилена (поли (пропиленоксид)), фланкированной двумя гидрофильными цепями полиоксиэтилена (поли(этиленоксид)), SOLUTOL HS 15 (макрогол-15 гидроксистеарат), LABRASOL (полиоксикаприловый глицерид), полиокси-10-олеиловый эфир, TWEEN (сложные эфиры полиоксиэтиленсорбитана и жирных кислот), этанол и полиэтиленгликоль. В одном из вариантов воплощения состав содержит полуксамер. Эти сополимеры обычно обозначают буквой «Р» (полуксамер), за которой следуют три цифры: первые две цифры x 100 обозначают приблизительную молекулярную массу полиоксипропиленового ядра, а последняя цифра x 10 обозначает процентное содержание полиоксиэтилена. В одном из вариантов воплощения выбран полуксамер 188. Поверхностно-активное вещество может присутствовать в количестве от приблизительно 0,0005% до приблизительно 0,001% суспензии.

Векторы вводят в количествах, достаточных для трансфекции клеток и обеспечения достаточных уровней переноса и экспрессии генов, чтобы обеспечить терапевтический эффект без чрезмерных побочных эффектов или с приемлемыми с медицинской точки зрения физиологическими эффектами, которые могут быть определены специалистами в области медицины. Обычные и фармацевтически приемлемые пути введения включают, но не ограничиваются этим, прямую доставку в желаемый орган (например, печень (необязательно через печеночную артерию), легкие, сердце, глаз, почки), пероральный, ингаляционный, интраназальный, интратекальный, интратрахеальный, внутриартериальный, прямую доставку в глаз (необязательно через глазную доставку, субретинальную инъекцией, интратетинальной инъекцией, интравитреально, местно), внутривенный, внутримышечный, подкожный, внутрикожный и другие исходные пути введения. В одном из вариантов воплощения путь введения представляет собой субретинальную или интравитреальную инъекцию. При желании способы введения можно комбинировать.

Дозировки вирусного вектора будут зависеть в первую очередь от таких факторов, как состояние, которое лечат, возраст, вес и состояние здоровья пациента, и, таким образом, могут варьировать среди пациентов. Например, терапевтически эффективная

доза вирусного вектора для человека обычно находится в диапазоне от приблизительно 25 до приблизительно 1000 микролитров на приблизительно 100 мл раствора, содержащего концентрации приблизительно от  $1 \times 10^9$  до  $1 \times 10^{16}$  вирусного вектора с геномом. Дозировка будет регулироваться для уравнивания терапевтического эффекта с любыми побочными эффектами, и такие дозировки могут варьировать в зависимости от терапевтического применения, для которого используется рекомбинантный вектор. Уровни экспрессии трансгена можно контролировать, чтобы определить частоту дозирования, приводящую к вирусным векторам, предпочтительно векторам AAV, содержащим миниген. Необязательно, схемы дозирования, подобные описанным для терапевтических целей, могут быть использованы для иммунизации с использованием композиций по изобретению.

Композиции вирусов с дефектом репликации могут быть составлены в виде единиц дозирования таким образом, чтобы содержать количество вируса с дефектом репликации, которое находится в диапазоне от приблизительно  $1,0 \times 10^9$  GC до приблизительно  $1,0 \times 10^{16}$  GC (для лечения среднего субъекта с массой тела 70 кг), включая все целые числа или дробные количества в пределах диапазона, и предпочтительно от  $1,0 \times 10^{12}$  GC до  $1,0 \times 10^{14}$  GC для пациента человека. В одном из вариантов воплощения композиции составлены таким образом, чтобы они содержали 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  $9 \times 10^9$  GC на дозу, включая все целые числа или дробные количества в пределах диапазона. В другом варианте воплощения композиции составлены таким образом, чтобы они содержали 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  $9 \times 10^{10}$  GC на дозу, включая все целые числа или дробные количества в пределах диапазона. В другом варианте воплощения композиции составлены таким образом, чтобы они содержали 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  $9 \times 10^{11}$  GC на дозу, включая все целые числа или дробные количества в пределах диапазона. В другом варианте воплощения композиции составлены таким образом, чтобы они содержали 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  $9 \times 10^{12}$  GC на дозу, включая все целые числа или дробные количества в пределах диапазона. В другом варианте воплощения композиции составлены таким образом, чтобы они содержали 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  $9 \times 10^{13}$  GC на дозу, включая все целые числа или дробные количества в пределах диапазона. В другом варианте воплощения композиции составлены таким образом, чтобы они содержали 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  $9 \times 10^{14}$  GC на дозу, включая все целые числа или дробные количества в пределах диапазона. В другом варианте воплощения композиции составлены таким образом, чтобы они содержали 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  $9 \times 10^{15}$  GC на дозу, включая все целые числа или дробные количества в пределах диапазона. В одном из вариантов воплощения, для применения людям, доза может находиться в диапазоне от  $1 \times 10^{10}$  до приблизительно  $1 \times 10^{12}$  GC на дозу, включая все целые числа или дробные количества в пределах

диапазона.

Указанные выше дозы можно вводить в различных объемах носителя, наполнителя или буферной композиции в диапазоне от приблизительно 25 до приблизительно 1000 микролитров или в более высоких объемах, включая все числа в диапазоне, в зависимости от размера области, подлежащей лечению, используемого титра вируса, способа введения и желаемого эффекта способа. В одном из вариантов воплощения объем носителя, наполнителя или буфера составляет по меньшей мере приблизительно 25 мкл. В одном из вариантов воплощения объем составляет приблизительно 50 мкл. В другом варианте воплощения объем составляет приблизительно 75 мкл. В другом варианте воплощения объем составляет приблизительно 100 мкл. В другом варианте воплощения объем составляет приблизительно 125 мкл. В другом варианте воплощения объем составляет приблизительно 150 мкл. В другом варианте воплощения объем составляет приблизительно 175 мкл. В еще одном из вариантов воплощения объем составляет приблизительно 200 мкл. В другом варианте воплощения объем составляет приблизительно 225 мкл. В еще одном из вариантов воплощения объем составляет приблизительно 250 мкл. В еще одном из вариантов воплощения объем составляет приблизительно 275 мкл. В еще одном из вариантов воплощения объем составляет приблизительно 300 мкл. В еще одном из вариантов воплощения объем составляет приблизительно 325 мкл. В другом варианте воплощения объем составляет приблизительно 350 мкл. В другом варианте воплощения объем составляет приблизительно 375 мкл. В другом варианте воплощения объем составляет приблизительно 400 мкл. В другом варианте воплощения объем составляет приблизительно 450 мкл. В другом варианте воплощения объем составляет приблизительно 500 мкл. В другом варианте воплощения объем составляет приблизительно 550 мкл. В другом варианте воплощения объем составляет приблизительно 600 мкл. В другом варианте воплощения объем составляет приблизительно 650 мкл. В другом варианте воплощения объем составляет приблизительно 700 мкл. В другом варианте воплощения объем составляет между приблизительно 700 и 1000 мкл.

В некоторых вариантах воплощения доза может находиться в диапазоне от приблизительно  $1 \times 10^9$  GC/г массы мозга до приблизительно  $1 \times 10^{12}$  GC/г массы мозга. В некоторых вариантах воплощения доза может находиться в диапазоне от приблизительно  $3 \times 10^{10}$  GC/г массы мозга до приблизительно  $3 \times 10^{11}$  GC/г массы мозга. В некоторых вариантах воплощения доза может находиться в диапазоне от приблизительно  $5 \times 10^{10}$  GC/г массы мозга до приблизительно  $1,85 \times 10^{11}$  GC/г массы мозга.

В другом аспекте предложена водная суспензия, подходящая для введения субъекту. В одном из вариантов воплощения суспензия включает водную суспендирующую жидкость и от приблизительно  $1 \times 10^9$  вирусных частиц до приблизительно  $1 \times 10^{13}$  GC или вирусных частиц на глаз рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), как описано в настоящем документе,

используемых в качестве терапевтического средства для лечения или профилактики заболеваний глаз. В одном из вариантов воплощения суспензия подходит для субретинальной или интравитреальной инъекции.

В одном из вариантов воплощения вирусные конструкции могут быть доставлены в дозах от, по меньшей мере приблизительно  $1 \times 10^9$  GC до приблизительно  $1 \times 10^{15}$  GC или от приблизительно  $1 \times 10^{11}$  GC до  $5 \times 10^{13}$  GC. Подходящие объемы для доставки этих доз и концентраций могут быть определены специалистом в данной области техники. Например, можно выбрать объемы приблизительно от 1 мкл до 150 мл, при этом более высокие объемы будут выбраны для взрослых. Обычно для новорожденных подходящий объем составляет от приблизительно 0,5 мл до приблизительно 10 мл, для детей более старшего возраста можно выбрать от приблизительно 0,5 мл до приблизительно 15 мл. Для малышей может быть выбран объем от приблизительно 0,5 мл до приблизительно 20 мл. Для детей можно выбрать объем до приблизительно 30 мл. Для дошкольного и подросткового возраста можно выбрать объем до приблизительно 50 мл. В других вариантах воплощения пациент может получить интратекальное введение в объеме от приблизительно 5 мл до приблизительно 15 мл, или от приблизительно 7,5 мл до приблизительно 10 мл. Могут быть определены другие подходящие объемы и дозировки. Дозировка будет регулироваться для уравнивания терапевтического эффекта с любыми побочными эффектами, и такие дозировки могут варьировать в зависимости от терапевтического применения, для которого используется рекомбинантный вектор.

Вышеописанные рекомбинантные векторы можно доставлять в клетки-хозяева в соответствии с опубликованными способами. rAAV, предпочтительно суспендированный в физиологически совместимом носителе, можно вводить пациенту человеку или млекопитающему, не являющимся человеком. В некоторых вариантах воплощения для введения пациенту человеку rAAV подходящим образом суспендируют в водном растворе, содержащем физиологический раствор, поверхностно-активное вещество и физиологически совместимую соль или смесь солей. Соответственно, состав доводят до физиологически приемлемого pH, например, в диапазоне от 6 до 9, или от 6,5 до 7,5, от 7,0 до 7,7 или от 7,2 до 7,8. Поскольку pH спинномозговой жидкости составляет от приблизительно 7,28 до приблизительно 7,32, для интратекальной доставки может потребоваться pH в этом диапазоне; тогда как для внутривенной, субретинальной или интравитреальной доставки может быть желательным pH от приблизительно 6,8 до приблизительно 7,2. Однако другие значения pH в самом широком диапазоне и эти поддиапазоны могут быть выбраны для другого пути доставки.

В другом варианте воплощения композиция включает носитель, разбавитель, наполнитель и/или адъювант. Подходящие носители могут быть легко выбраны специалистом в данной области техники с учетом признака, на который направлен переносимый вирус. Например, один подходящий носитель включает физиологический раствор, который может быть составлен с различными буферными растворами (например, забуференный фосфатом физиологический раствор). Другие типичные носители

включают стерильный физиологический раствор, лактозу, сахарозу, фосфат кальция, желатин, декстран, агар, пектин, арахисовое масло, кунжутное масло и воду. Буфер/носитель должен включать компонент, который предотвращает прилипание гAAV к инфузионной трубке, но не влияет на активность связывания гAAV *in vivo*. Подходящее поверхностно-активное вещество или комбинация поверхностно-активных веществ может быть выбрана из неионогенных поверхностно-активных веществ, которые не токсичны. В одном из вариантов воплощения выбирают дифункциональное блок-сополимерное поверхностно-активное вещество с концевыми первичными гидроксильными группами, например, такое как Pluronic® F68 [BASF], также известное как Poloxamer 188, который имеет нейтральный pH, имеет среднюю молекулярную массу 8400. Могут быть выбраны другие поверхностно-активные вещества и другие полуксамеры, то есть неионные триблочные сополимеры, состоящие из центральной гидрофобной цепи полиоксипропилена (поли (пропиленоксид)), фланкированной двумя гидрофильными цепями полиоксиэтилена (поли(этиленоксид)), SOLUTOL HS 15 (макрогол-15 гидроксистеарат), LABRASOL (полиоксикаприловый глицерид), полиокси-олеиловый эфир, TWEEN (сложные эфиры полиоксиэтиленсорбитана и жирных кислот), этанол и полиэтиленгликоль. В одном из вариантов воплощения состав содержит полуксамер. Эти сополимеры обычно обозначают буквой «Р» (полуксамер), за которой следуют три цифры: первые две цифры  $\times 100$  обозначают приблизительную молекулярную массу полиоксипропиленового ядра, а последняя цифра  $\times 10$  обозначает процентное содержание полиоксиэтилена. В одном из вариантов воплощения выбран полуксамер 188. Поверхностно-активное вещество может присутствовать в количестве от приблизительно 0,0005% до приблизительно 0,001% суспензии. В одном примере состав может содержать, например, забуференный физиологический раствор, содержащий один или более из следующих компонентов: хлорид натрия, бикарбонат натрия, декстроза, сульфат магния (например, сульфат магния  $7H_2O$ ), хлорид калия, хлорид кальция (например, хлорид кальция  $2H_2O$ ), двухосновный фосфат натрия и их смеси в воде. Соответственно, для интратекальной доставки осмолярность находится в диапазоне, совместимом с цереброспинальной жидкостью (например, от приблизительно 275 до приблизительно 290); см., например, [emedicine.medscape.com/article/2093316-overview](http://emedicine.medscape.com/article/2093316-overview). Необязательно, для интратекальной доставки коммерчески доступный разбавитель можно использовать в качестве суспендирующего агента или в комбинации с другим суспендирующим агентом и другими необязательными наполнителями. См., например, Elliotts B® solution [Lukare Medical]. В других вариантах воплощения состав может содержать один или более усилителей проницаемости. Примеры подходящих усилителей проницаемости могут включать, например, маннит, гликохолат натрия, таурохолат натрия, дезоксихолат натрия, салицилат натрия, каприлат натрия, капрат натрия, лаурилсульфат натрия, полиоксиэтилен-9-лауреловый эфир или ЭДТА.

Необязательно, композиции по изобретению могут содержать, помимо гAAV и носителя(ов), другие традиционные фармацевтические ингредиенты, такие как

консерванты или химические стабилизаторы. Подходящие иллюстративные консерванты включают хлорбутанол, сорбат калия, сорбиновую кислоту, диоксид серы, пропилгаллат, парабены, этилванилин, глицерин, фенол и параклорфенол. Подходящие химические стабилизаторы включают желатин и альбумин.

Композиции согласно настоящему изобретению могут содержать фармацевтически приемлемый носитель, такой как определено выше. Соответственно, описанные в данном документе композиции содержат эффективное количество одного или более AAV, суспендированных в фармацевтически подходящем носителе и/или смешанных с подходящими наполнителями, предназначенными для доставки субъекту посредством инъекции, осмотического насоса, интратекального катетера или для доставки другим устройством или путем. В одном примере композиция составлена для интратекальной доставки.

В контексте данного документа, термины «интратекальная доставка» или «интратекальное введение» относятся к способу введения лекарственных средств посредством инъекции в спинномозговой канал, более конкретно в субарахноидальное пространство, чтобы оно достигло спинномозговой жидкости (CSF). Интратекальная доставка может включать люмбальную пункцию, внутрижелудочковую (включая интрацеребровентрикулярную (ICV)), субокципитальную/интрацистермальную и/или C1-2 пункцию. Например, материал может быть введен для распространения по субарахноидальному пространству с помощью люмбальной пункции. В другом примере инъекция может производиться в мозжечково-мозговую цистерну.

Используемые в данном документе термины «внутрицистермальная доставка» или «внутрицистермальное введение» относятся к способу введения лекарств непосредственно в спинномозговую жидкость мозжечково-мозговой цистерны *cerebellomedullaris*, более конкретно, путем субокципитальной пункции или путем прямой инъекции в большую цистерну или через постоянно установленную трубку.

В одном аспекте векторы, представленные в настоящем документе, можно вводить интратекально с помощью способа и/или устройства. См., например, WO 2017/181113, которая включена в настоящий документ посредством ссылки. В качестве альтернативы могут быть выбраны другие устройства и способы. Способ включает этапы продвижения спинномозговой иглы в большую цистерну пациента, подсоединение отрезка гибкой трубки к проксимальной канюле спинальной иглы и выходного порта клапана к проксимальному концу гибкой трубки, а затем упомянутые этапы продвижения и соединения, и после того, как трубка будет заполнена спинномозговой жидкостью пациента, подключение первого сосуда, содержащего некоторое количество изотонического раствора, к входному отверстию для промывки клапана, и последующее соединение второго сосуда, содержащего некоторое количество фармацевтической композиции для вектора впускного порта клапана. После подключения первого и второго сосудов к клапану открывается путь для потока жидкости между входным портом вектора и выходным портом клапана, и фармацевтическая композиция вводится пациенту через

спинальную иглу, а после инъекции фармацевтической композиции канал для потока жидкости открывается через входной порт промывки и выпускной порт клапана, а изотонический раствор вводится в спинальную иглу для промывания фармацевтической композиции пациенту.

Каждый из этого способа и этого устройства может, необязательно, использоваться для интратекальной доставки композиций, представленных в настоящем документе. В качестве альтернативы для такой интратекальной доставки можно использовать другие способы и устройства.

Следует отметить, что термины в формах единственного числа имеют значение один или более. По существу, термины в формах единственного числа, «один или более» и «по меньшей мере один» используются в данном документе взаимозаменяемо.

Слова «содержать», «содержит» и «содержащий» следует интерпретировать включительно, а не исключительно. Слова «состоит», «состоящий» и их варианты следует интерпретировать исключительно, а не включительно. Хотя различные варианты воплощения в описании представлены с использованием термина «содержащий», при других обстоятельствах связанный вариант воплощения также предназначен для интерпретации и описания с использованием термина «состоящий из» или «состоящий практически из».

В контексте данного документа, термин «приблизительно» означает отклонение в 10% ( $\pm 10\%$ ) от приведенного исходного значения, если не указано иное.

В контексте данного документа, «заболевание», «нарушение» и «состояние» используются взаимозаменяемо для обозначения ненормального состояния у субъекта.

Если в данном описании не указано иное, технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в данной области техники, и со ссылкой на опубликованные тексты, которые предоставляют специалисту в данной области техники общее руководство по многим из терминов, используемых в настоящей заявке.

Термин «экспрессия», в контексте данного документа, используется в самом широком смысле и включает продукцию РНК или РНК и белка. Что касается РНК, термин «экспрессия» или «трансляция» относится, в частности, к продукции пептидов или белков. Экспрессия может быть временной или стабильной.

В контексте данного документа, термин «титр NAb» означает измерение количества продуцируемого нейтрализующего антитела (например, Nab против AAV), которое нейтрализует физиологический эффект его целевого эпитопа (например, AAV). Титры NAb против AAV могут быть измерены, как описано, например, в Calcedo, R., et al., Worldwide Epidemiology of Neutralizing Antibodies to Adeno-Associated Viruses. Journal of Infectious Diseases, 2009. 199(3): p. 381-390, которая включена в данном документе в качестве ссылки.

В контексте данного документа, термин «экспрессионная кассета» относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая содержит кодирующую последовательность,

промотор и может включать другие регуляторные последовательности для них, и эта кассета может быть доставлена через генетический элемент (например, плазмиду) к упаковывающей клетке-хозяину и упакована в капсид вирусного вектора (например, вирусной частицы). Как правило, такая кассета экспрессии для создания вирусного вектора содержит кодирующую последовательность для продукта гена, описанного в данном документе, фланкированного сигналами упаковки вирусного генома и другими последовательностями контроля экспрессии, такими как описанные в настоящем документе.

Аббревиатура «sc» относится к самокомплементарному. «Самокомплементарный AAV» относится к конструкции, в которой кодирующая область, несущая последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты AAV, была сконструирована для образования внутримолекулярной двухцепочечной матрицы ДНК. После инфицирования, вместо того, чтобы ждать опосредованного клетками синтеза второй цепи, две комплементарные половины scAAV будут соединяться с образованием одной единицы двухцепочечной ДНК (дцДНК), готовой 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, каждый из которых полностью включен в настоящий документ посредством ссылки.

В контексте данного документа, термин «функционально связанный» относится как к последовательностям контроля экспрессии, которые примыкают к представляющему интерес гену, так и к последовательностям контроля экспрессии, которые действуют в транс-конфигурации или на расстоянии, чтобы контролировать интересующий ген.

Термин «гетерологичный» при использовании по отношению к белку или нуклеиновой кислоте указывает на то, что белок или нуклеиновая кислота содержит две или более последовательностей или подпоследовательностей, которые не находятся в одинаковых отношениях друг с другом в природе. Например, нуклеиновую кислоту обычно получают рекомбинантно, имея две или более последовательностей из неродственных генов, организованных для образования новой функциональной нуклеиновой кислоты. Например, в одном из вариантов воплощения, нуклеиновая кислота имеет промотор из одного гена, расположенный так, чтобы управлять экспрессией кодирующей последовательности из другого гена. Таким образом, со ссылкой на кодирующую последовательность промотор является гетерологичным.

«Вирус с дефектом репликации» или «вирусный вектор» относится к синтетической или искусственной вирусной частице, в которой кассета экспрессии, содержащая интересующий ген, упакована в вирусный капсид или оболочку, где любые вирусные геномные последовательности, также упакованные в вирусный капсид или оболочку, являются недостаточными по репликации, т. е. они не могут генерировать

потомство вирионов, но сохраняют способность инфицировать клетки-мишени. В одном из вариантов воплощения геном вирусного вектора не включает гены, кодирующие ферменты, необходимые для репликации (геном можно сконструировать так, чтобы он был «выпотрошенным» - содержащим только интересующий трансген, фланкированный сигналами, необходимыми для амплификации и упаковки искусственного генома), но эти гены могут поставляться в процессе получения. Следовательно, он считается безопасным для использования в генной терапии, поскольку репликация и инфицирование потомственными вирионами не могут происходить, кроме как в присутствии вирусного фермента, необходимого для репликации.

Во многих случаях частицы gAAV называют устойчивыми к ДНКазе. Однако, в дополнение к этой эндонуклеазе (ДНКазе), другие эндо- и экзонуклеазы также могут использоваться на этапах очистки, описанных в данном документе, для удаления загрязняющих нуклеиновых кислот. Такие нуклеазы могут быть выбраны для деградации одноцепочечной ДНК и/или двухцепочечной ДНК и РНК. Такие этапы могут включать одну нуклеазу или смеси нуклеаз, направленных на разные мишени, и могут быть эндонуклеазами или экзонуклеазами.

Термин «устойчивый к нуклеазам» указывает на то, что капсид AAV полностью собрался вокруг кассеты экспрессии, которая предназначена для доставки трансгена в клетку-хозяина и защищает эти упакованные геномные последовательности от деградации (расщепления) во время этапов инкубации нуклеаз, предназначенных для удаления контаминирующих нуклеиновых кислот, которые могут присутствовать в процессе получения.

Термин «трансляция», в контексте данного документа, относится к процессу на рибосоме, где цепь мРНК контролирует сборку аминокислотной последовательности для образования белка или пептида.

Используемые в данном описании и формуле изобретения термины «содержащий» и «включающий» включают другие компоненты, элементы, целые числа, этапы и тому подобное. И наоборот, термин «состоящий» и его варианты исключают другие компоненты, элементы, целые числа, этапы и тому подобное.

Как описано выше, термин «приблизительно», когда он используется для изменения числового значения, означает отклонение в  $\pm 10\%$ , если не указано иное.

Следующие примеры ниже являются только иллюстративными и не предназначены для ограничения настоящего изобретения.

#### ПРИМЕРЫ

В следующих примерах сообщается об обширном дезамидировании AAV8 и дополнительных различных серотипов AAV с подтверждающими данными, полученными из структурных, биохимических и масс-спектрометрических подходов. Степень дезамидирования на каждом сайте зависела от возраста вектора и множества факторов первичной последовательности и 3D-структур, но в значительной степени не зависела от условий выделения и очистки вектора. Мы демонстрируем потенциал дезамидирования

для воздействия на активность векторной трансдукции и коррелируем потерю ранней временной точки в векторной активности с быстро прогрессирующим спонтанным дезамидированием некоторых аспарагинов AAV8. Мы исследуем мутационные стратегии, которые стабилизируют амиды боковых цепей, улучшают трансдукцию векторов и снижают молекулярную изменчивость от партии к партии, что является ключевой проблемой при производстве биопрепаратов. Это исследование иллюстрирует ранее неизвестный аспект гетерогенности капсида AAV и подчеркивает его важность в разработке этих векторов для генной терапии.

В примере 1 представлена характеристика посттрансляционных модификаций капсида вектора AAV8 с помощью одно- и двумерного гель-электрофореза, масс-спектрометрии и структурного моделирования *de novo*. После идентификации ряда предполагаемых сайтов дезамидирования на поверхности капсида мы оцениваем их влияние на структуру и функцию капсида как *in vitro*, так и *in vivo*. В примере 1 этот анализ расширен на AAV9, чтобы определить, применимо ли это явление к серотипам, отличным от AAV8, подтверждая, что дезамидирование капсида AAV не является серотип-специфичным. Примеры 2-5 демонстрируют дезамидирование в различных AAV.

**ПРИМЕР 1** Дезамидирование аминокислот на поверхности капсидов аденоассоциированных вирусов

#### A. Материалы и способы

##### 1. 1D и 2D гель-электрофорез

Для 1D SDS-электрофореза в полиакриламидном геле (SDS-PAGE) мы сначала денатурировали векторы AAV при 80°C в течение 20 минут в присутствии додецилсульфата лития и восстанавливающего агента. Затем мы пропускали их на 4-12% геле Бис-Трис в течение 90 минут при 200 В и окрашивали кумасси синим. 2D гель-электрофорез для данных на ФИГ. 1A - ФИГ. 1D, выполнила Kendrick Laboratories, Inc. (Мэдисон, Висконсин). Для последующих экспериментов мы выполняли 2D SDS-PAGE собственными силами. Для этого мы объединили  $3 \times 10^{11}$  GC вектора AAV с маркером турбонуклеазы 500U (Accelagen, Сан-Диего, Калифорния) в 150 мкл фосфатно-солевого буфера (PBS) с 35 mM NaCl и 1 mM MgCl<sub>2</sub> и инкубировали при 37°C в течение десяти минут. Затем мы добавили девять объемов абсолютного этанола, встряхнули образцы и инкубировали их при минус 80°C в течение по меньшей мере двух часов, затем инкубировали на льду в течение пяти минут и центрифугировали на максимальной скорости в течение 30 минут при 15°C. Мы декантировали супернатант и высушили осадок на воздухе, который затем ресуспендировали в буфере для ресуспендирования № 1 [0,15% SDS, 50 mM дитиотреитол (DTT), 10 mM Трис pH 7,5 и 1 мкл амфолитов pH6-9, ThermoFisher ZM0023, добавленных через день, в ddH<sub>2</sub>O] и инкубировали без перемешивания при комнатной температуре. Через 30 минут мы встряхнули пробирки для образцов, чтобы перемешать их, добавили 1 мкг маркера куриного кональбумина (Sigma Aldrich, Сент-Луис, Миссури) и инкубировали образцы при 37°C в течение 30 минут, перемешивая легкими ударами в течение 15 минут. Затем образцы переносили при 50°C

на 15-20 минут, перемешивали на вортексе, инкубировали при 95°C в течение 2,5 минут и давали остыть перед центрифугированием на максимальной скорости в течение одной минуты и кратковременным вортексированием. Затем мы смешали 10 мкл каждого образца с 140 мкл буфера для ресуспендирования № 2 (9,7 М мочевины, 2% CHAPS, 0,002% бромфенолового синего и 0,05% амфолитов, описанных выше, добавленных в тот же день в ddH<sub>2</sub>O) и инкубировали при комнатной температуре в течение десяти минут. Затем мы наносили смеси на полоски с иммобилизованным градиентом pH (IPG) с pH 6-10 (ThermoFisher Уолтем, Массачусетс) и запускали их в системе ZOOM IPGRunner в соответствии с инструкциями производителя. Мы использовали следующие параметры изоэлектрической фокусировки: 100-1000 В в течение 120 минут, 1000-2000 В в течение 120 минут, 2000 В в течение 120 минут, пределы 0,1 Вт и 0,05 мА на цикл. Затем полоски IPG измельчали и загружали в однолуночный 4-12% гель Бис-Трис и прогоняли в 1D, как описано выше. Мы определили относительную миграцию VP AAV путем сравнения с белками внутреннего контроля турбонуклеазой (Accelagen, 27 кДа) и кональбумином куриного яичного белка (Sigma Aldrich, 76 кДа, pI 6,0-6,6).

## 2. Получение вектора

Vector Core из Пенсильванского университета произвел рекомбинантные векторы AAV для 1D и 2D гель-электрофореза и масс-спектрометрических экспериментов и очистил их с помощью градиентов хлорида цезия или йодиксанола, как описано ранее. (Lock M, et al. Hum Gene Ther 2010; 21(10):1259-71; Gao GP, et al. Proc Natl Acad Sci USA. 2002; 99(18):11854-9). Мы получили аффинно очищенные векторы следующим образом: Мы выращивали клетки HEK293 в десяти 36-слойных сосудах Hyperstack (Corning), котрансфицировали их смесью плазмиды с векторным геномом (pAAV-LSP-IVS2.hFIXco-WPRE-bGH), транс-плазмиды, содержащей гены *потора* AAV2 и капсида AAV8, и вспомогательной плазмиды аденовируса. Мы использовали PEIpro (PolyPlus) в качестве реагента для трансфекции. Через пять дней после трансфекции супернатант собирали, очищали через фильтры Sartoguard PES Midicap (Sartorius Stedim) и обрабатывали бензоназой (Millipore), после чего добавляли соль, чтобы довести его до 0,6 М. Осветленный основной собранный материал концентрировали в десять раз путем фильтрации с тангенциальным потоком (TFF) и затем подвергали диафильтрации против четырех объемов загрузочного буфера аффинной колонки. Мы захватили векторы на аффинной колонке POROS CaptureSelect (ThermoFisher) и элюировали пик вектора при низком pH непосредственно в нейтрализующий буфер. Мы развели нейтрализованный элюат в буфере для связывания с высоким pH и загружали его на анионообменную колонку для доочистки (Cimultus QA-8; Bia Separations), где препарат был обогащен геном-содержащими (полными) частицами. Частицы полного вектора с помощью пологого солевого градиента элюировали и немедленно нейтрализовали. Наконец, мы подвергли вектор второму циклу TFF для конечной концентрации и замены буфера на буфер для композиции (PBS+0,001% плуроник F-68).

Мы получили мутантные векторы для анализов *in vitro* путем мелкомасштабной

тройной трансфекции клеток HEK293 в шестилуночных планшетах. Мы смешали 5,6 мкл раствора полиэтиленимина с концентрацией 1 мг/мл в 90 мкл бессывороточной среды с плазмидной ДНК (0,091 мкг цис-плазмиды, 0,91 мкг транс-плазмиды, 1,82 мкг плазмиды deltaF6 Ad-helper в 90 мкл бессывороточной среды), инкубировали при комнатной температуре в течение 15 минут, и добавили его к клеткам и дополнительно 0,8 мл свежей бессывороточной среды. На следующий день мы заменили 0,5 мл верхней среды полной средой с сывороткой. Мы собирали вектор через три дня после трансфекции с помощью трех циклов замораживания/оттаивания с последующим центрифугированием для удаления клеточного дебриса и сбора супернатанта. Цис-плазида содержала кассету трансгена, кодирующую трансген люциферазы светлячка под контролем промотора куриного бета-актина (CB7) с химерным интроном Promega и сигналом полиаденилирования бета-глобина кролика (RBG). Транс-плазида кодировала ген cap wtAAV8; для создания мутантных вариантов cap AAV8 мы использовали набор Quikchange Lightning Mutagenesis (Agilent Technologies, Уилмингтон, Делавэр). Вектор был титрован, как описано ранее. (Lock M, et al. Hum Gene Ther 2010; 21(10):1259-71).

Для экспериментов по получению векторов в зависимости от времени мы генерировали вектор путем тройной трансфекции клеток HEK293 в средних размерах в 15-сантиметровых чашках для культивирования тканей. На чашку мы смешали 36 мкл раствора полиэтиленимина с концентрацией 1 мг/мл в 2 мл бессывороточной среды с плазмидной ДНК (0,6 мкг цис-плазмиды, 5,8 мкг транс-плазмиды, 11,6 мкг плазмиды Ad-helper deltaF6), инкубировали при комнатной температуре в течение 15 минут и добавляли его к клеткам приблизительно при 60% конфлюэнтности на планшетах, наполненных 14 мл бессывороточной среды. На следующий день мы заменили 8 мл верхней среды свежей полной средой с сывороткой. Мы собирали вектор, собирая всю верхнюю среду, соскребая клетки с чашки и замораживая ее при минус 80°C. Мы извлекли неочищенный вектор из смеси супернатант/клетки, применив 3 цикла замораживания/оттаивания и осветив лизат центрифугированием. Мы очистили и сконцентрировали вектор для масс-спектрометрического анализа, добавив бензоназу, 1 М Трис pH 7,5 и 5 М NaCl к осветленному лизату до конечных концентраций 20 mM Трис и 360 mM NaCl. Мы захватили векторы на аффинной колонке POROS CaptureSelect объемом 1 мл и элюировали пик вектора при низком pH непосредственно в нейтрализующий буфер. Фракции анализировали по оптической плотности при 280 нм, а наиболее концентрированную фракцию подвергали масс-спектрометрическому анализу.

Для экспериментов *in vivo* мы получили векторы, как описано ранее, с капсидом wtAAV8 или с одним из 6 мутантов дезамидирования; кассета трансгена включала промотор CB7, интрон PI, трансген люциферазы светлячка и сигнал полиаденилирования RBG (Lock M, et al. Hum Gene Ther 2010; 21(10):1259-71).

### 3. Масс-спектрометрический пробег/расщепленное/анализ

*Материалы:* Мы приобрели бикарбонат аммония, DTT, йодацетамид (IAM) и воду, обогащенную  $^{18}\text{O}$  (чистота 97,1%), у Sigma (Сент-Луис, Миссури); и ацетонитрил,

муравьиную кислоту, трифторуксусную кислоту (TFA), 8М гуанидин гидрохлорид (GndHCl) и трипсин от Thermo Fischer Scientific (Рокфорд, Иллинойс).

*Расщепление трипсином:* Мы приготовили исходные растворы 1М DTT и 1,0М йодацетамида. Белки капсида денатурировали и восстанавливали при 90°C в течение десяти минут в присутствии 10 мМ DTT и 2М GndHCl. Мы позволили образцам остыть до комнатной температуры, а затем алкилировали их 30 мМ IAM при комнатной температуре в течение 30 минут в темноте. Мы гасили реакцию алкилирования добавлением 1 мл DTT. Мы добавили 20 мМ бикарбоната аммония (pH 7,5-8) к раствору денатурированного белка в объеме, который разбавлял конечную концентрацию GndHCl до 200 мМ. Мы добавили раствор трипсина для соотношения трипсина к белку 1:20 и инкубировали при 37°C в течение ночи. После расщепления мы добавили TFA до конечной концентрации 0,5%, чтобы погасить реакцию расщепления.

Для экспериментов с 18O-водой образец капсида сначала заменяли буфером на 100 мМ бикарбоната аммония, полученного в 18O-воде, с использованием спиновых обессоливающих колонок Zeba (Thermo Scientific, Рокфорд, Иллинойс). Чтобы обеспечить полное удаление воды из образца, мы дважды производили замену буфера. Мы приготовили исходные растворы 1М DTT и 1М IAM в 18O-воде. Мы следовали тем же этапам денатурации, алкилирования и расщепления, что и выше, с реагентами и буферами на основе 18O-воды.

*Жидкостная хроматография с tandemной масс-спектрометрией:* Мы провели онлайн-хроматографию с колонкой Acclaim PepMap (длина 15 см, внутренний диаметр 300 мкм) и системой RSLC Thermo UltiMate 3000 (Thermo Fisher Scientific), соединенной с Q Exactive HF с источником NanoFlex (Thermo Fisher Scientific). Во время онлайн-анализа температура колонки поддерживалась на уровне 35°C. Мы разделили пептиды с градиентом подвижной фазы А (вода MilliQ с 0,1% муравьиной кислоты) и подвижной фазы В (ацетонитрил с 0,1% муравьиной кислоты). Мы использовали градиент от 4% В до 6% В в течение 15 минут, до 10% В в течение 25 минут (всего 40 минут), а затем до 30% В в течение 46 минут (всего 86 минут). Мы загрузили образцы прямо в колонку. Размер колонки составлял 75 см x внутренний диаметр 15 мкм и она была упакована средой C18 2 микрона (Acclaim PepMap). Из-за стадий загрузки, ввода и промывки общее время каждого цикла жидкостной хроматографии с tandemной масс-спектрометрией составляло приблизительно двух часов.

Мы получили данные масс-спектрометрии с использованием зависимого от данных способа топ-20 на масс-спектрометре Q Exactive HF, динамически выбирая наиболее распространенные ионы-предшественники, еще не секвенированные, из обзорных сканирований (200-2000 м/з). Мы выполнили секвенирование с помощью более высокой энергии фрагментации столкновительной диссоциации с целевым значением ионов  $1e5$ , определенным с помощью прогнозирующего автоматического управления усилением; мы проводили выделение предшественников с окном 4м/з. Мы получили обзорные снимки с разрешением 120 000 при 200 м/з. Мы установили разрешение для

спектров HCD на 30 000 при  $m/z$  200 с максимальным временем ввода ионов 50 мс и нормализованной энергией столкновения 30. Мы установили уровень RF для S-линзы равным 50, что обеспечило оптимальную трансмиссию  $m/z$  области, занятой пептидами из нашего гидролизата. Мы исключили ионы-предшественники с одиночным, неназначенным или шестью и более высокими состояниями заряда из выборки фрагментации.

*Обработка данных:* Мы использовали программное обеспечение BioPharma Finder 1.0 (Thermo Fischer Scientific) для анализа всех полученных данных. Для картирования пептидов мы выполнили поиски с использованием базы данных FASTA с однократной записью белков, в которой карбамидометилирование задано как фиксированная модификация, а окисление, дезамидирование и фосфорилирование как переменные модификации. Мы использовали точность масс 10 ppm, высокую протеазную специфичность и уровень достоверности 0,8 для спектров tandemной масс-спектрометрии. Масс-спектрометрическая идентификация дезамидированных пептидов относительно проста, так как дезамидирование добавляет к массе интактной молекулы +0,984 Да (разница масс между группами -ОН и -NH<sub>2</sub>). Мы определили процент дезамидирования конкретного пептида, разделив массовую площадь дезамидированного пептида на сумму площади дезамидированного и нативного пептидов. Учитывая количество возможных сайтов дезамидирования, изобарные частицы, которые дезамидированы в разных сайтах, могут совместно мигрировать в одном пике. Следовательно, фрагментные ионы, происходящие из пептидов с множественными потенциальными сайтами дезамидирования, можно использовать для определения местоположения или дифференциации множества сайтов дезамидирования. В этих случаях относительные интенсивности в пределах наблюдаемых изотопных паттернов можно использовать для конкретного определения относительного содержания различных изомеров дезамидированного пептида. Этот способ предполагает, что эффективность фрагментации для всех изомерных частиц одинакова и не зависит от места дезамидирования. Этот подход позволяет определить конкретные сайты, участвующие в дезамидировании, и возможные комбинации, участвующие в дезамидировании.

*Вторичная обработка данных:* Вторичный анализ необработанных данных масс-спектрометрии был выполнен в Университете Мэриленда, округ Балтимор, с использованием следующего способа. Программное обеспечение Peaks Studio v5.3 (Bioinformatics Solutions Inc.) использовалось для всего масс-спектрометрического анализа. Уточнение данных файлов необработанных данных было выполнено со следующими параметрами: допуск по соотношению  $m/z$  предшественника не более 10 ppm и состояние заряда предшественника с минимумом 2, максимумом 4. Секвенирование de novo входного спектра было выполнено с использованием алгоритма Peaks с допуском ошибки по ионам-предшественникам 10 ppm и допусками ошибок по ионам продуктов 0,1 Да. Фермент расщепления был установлен как трипсин, переменными модификациями были окисление, фосфорилирование и дезамидирование, а фиксированной модификацией

было карбамидометилирование цистеина.

#### 4. Структурный анализ капсида AAV

Мы получили координаты атомов AAV8, структурные факторы и связанную модель капсида из базы данных белков RCSB (PDB ID: 3RA8). Мы выполнили уточнение структуры и сгенерировали электронную плотность, независимую от первичной аминокислотной последовательности VP3 AAV8, для использования в трехмерном (3D) структурном анализе капсида. Мы выполнили этот анализ, чтобы наблюдать электронную плотность изоаспарагиновой кислоты в капсиде AAV8, которая не была искажена ожидаемой первичной последовательностью VP3 AAV8. Используя полученную структуру, мы смоделировали четыре аспарагина в первичной последовательности VP3 AAV8 с N+1 глицинами в качестве изоаспарагиновых кислот, а затем уточнили структуру капсида AAV8 с помощью программного обеспечения Crystallography and NMR System (CNS), строго наложив икосаэдрические некристаллографические матрицы с использованием стандартного протокола уточнения (Brunger AT, et al. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 1998; 54(Pt 5):905-21). Мы получили структурную модель изоаспарагиновой кислоты из базы данных HIC-UP с последующим созданием молекулярного словаря в PRODRG для уточнения структуры (Kleywegt GJ *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2007; 63 (Pt 1): 94-100). Затем мы рассчитали карту средней электронной плотности капсида AAV8 (также в CNS) и визуализировали ее с помощью программного обеспечения COOT с последующими небольшими корректировками полученной модели, чтобы смоделированные остатки изоаспарагиновой кислоты соответствовали карте электронной плотности (Emsley P and Cowtan K *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2004; 60(Pt 12 Pt 1):2126-32). Мы повторили этот протокол для дополнительной модели N512 в первичной последовательности VP3 AAV9 с N+1 глицинами (PDB ID: 3UX1). Мы сгенерировали все фигуры, используя COOT, PyMol и UCSF Chimera (Emsley P and Cowtan K *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2004; 60 (Pt 12 Pt 1): 2126-32; DeLano WL *PyMOL: An Open-Source Molecular Graphics Tool* Vol. 40, 2002:82-92; Pettersen EF, et al. *J Comput Chem* 2004; 25(13):1605-12). Мы получили ряд структур ранее идентифицированных дезамидированных белков (ID PDB: 1DY5, 4E7G, 1RTU, 1W9V, 4E7D и 1C9D) для сравнения их карты электронной плотности для остатков дезамидированной изоаспарагиновой кислоты со смоделированными нами остатками изоаспарагиновой кислоты из AAV8 и AAV9 (Rao FV, et al. *Chem Biol* 2005; 12(1):65-76; Noguchi S, et al. *Biochemistry* 1995; 34(47):15583-91; Esposito L, et al. *J Mol Biol* 2000; 297(3):713-32).

Мы определили температурные факторы для дезамидированных остатков путем усреднения температурных факторов для каждого атома каждого остатка аспарагина, представленных в атомных координатах кристаллической структуры AAV8 или AAV9 (PDB ID: 3RA8, 3UX1).

#### 5. Исследования на животных

Комитет по содержанию и использованию лабораторных животных

Пенсильванского университета одобрил все процедуры с животными. Для оценки эффективности вектора мы вводили  $3 \times 10^8$  GC wtAAV8 или вектор с мутантным капсидом восьминедельным мышам C57BL/6 внутривенно через инъекцию в хвостовую вену в объеме 100 мкл. Всех мышей умерщвляли на 14 день. Для оценки экспрессии люциферазы *in vivo* мышей (~ 20 г) анестезировали и внутрибрюшинно вводили 200 мкл или 15 мг/мл субстрата люциферина (Perkin Elmer, Уолтем, Массачусетс). Изображение мышей получали через пять минут после введения люциферина и получали изображение с помощью системы визуализации IVIS Xenogen In Vivo. Мы использовали программное обеспечение Living Image 3.0 для количественной оценки сигнала в описанных областях интереса. Мы сняли замеры на 7 и 14 день.

#### 6. Оценка титра мутантного вектора и эффективности трансдукции *in vitro*

Мы определили титры векторов с помощью кПЦР геномов, устойчивых к ДНКзе I. Праймеры кПЦР отжигаются с последовательностью полиаденилирования упакованного трансгена. Для оценки эффективности векторной трансдукции *in vitro* по экспрессии люциферазы мы высевали  $0,9 \times 10^5$  клеток Huh7/лунку в 96-луночный планшет с черными стенками в полной среде DMEM (10% фетальной бычьей сыворотки, 1% пенициллин/стрептомицин). На следующий день мы удалили среду и заменили ее 50 мкл неочищенного или очищенного вектора, разбавленного полной средой. Мы протестировали 4 разведения в серии 3-кратных разведений для каждого неочищенного векторного образца. Через 48 часов мы приготовили люциферин (Promega, Мэдисон, Висконсин) в полной среде в концентрации 0,3 мкг/мкл и добавили его к трансдуцированным клеткам в объеме 50 мкл. Результаты были прочитаны на люминометре Biotek Clarity. Мы обнаружили, что активность люциферазы/GC, добавленной к клеткам-мишеням, является постоянной в широком диапазоне GC, но может стать насыщенной при высоких MOI. Таким образом, мы проверяем данные серии разведений (люминесцентные единицы по сравнению с GC) на линейность, исключаем наивысшую точку, если насыщение очевидно, и вычисляем среднее значение люциферазы/GC для значений в линейном диапазоне каждого анализа для каждого варианта. Это дает значение эффективности трансдукции. Данные нормализованы для упрощения сравнения путем установки контроля wt на значение 1.

#### 7. Биораспределение

Мы экстрагировали ДНК из образцов печени с помощью набора QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Хильден, Германия), а затем проанализировали ДНК для векторной GC с помощью ПЦР в реальном времени, как описано ранее, с набором праймеров/зондов, разработанных против сигнала полиаденилирования RBG кассеты трансгена (Chen SJ, et al. Hum Gene Ther Clin Dev 2013; 24(4):154-60).

#### Последовательности праймеров для мутантов AAV8

|               | Последовательность          | Описание      |
|---------------|-----------------------------|---------------|
| SED ID NO: 56 | CGACAACCGGGCAAAACcagAATAGCA | QC мутагенные |

|               |                                            |                                                          |
|---------------|--------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
|               | ACTTTGCCTGG                                | праймеры для изменения<br>N499 AAV8 в Q                  |
| SED ID NO: 57 | CCAGGCAAAGTTGCTATTCTGGTTTTG<br>CCCGGTTGTCG | QC мутагенные<br>праймеры для изменения<br>N499 AAV8 в Q |
| SED ID NO: 58 | GACAACCGGGCAAAACgacAATAGCAA<br>CTTTGCCTG   | QC мутагенные<br>праймеры для изменения<br>N499 AAV8 в D |
| SED ID NO: 59 | CAGGCAAAGTTGCTATTGTCGTTTTGC<br>CCGGTTGTC   | QC мутагенные<br>праймеры для изменения<br>N499 AAV8 в D |
| SED ID NO: 60 | GGAGGCACGGCAcagACGCAGACTCTG<br>GG          | qc мутагенные праймеры<br>для изменения N459<br>AAV8 в Q |
| SED ID NO: 61 | CCCAGAGTCTGCGTCTGTGCCGTGCCT<br>CC          | qc мутагенные праймеры<br>для изменения N459<br>AAV8 в Q |
| SED ID NO: 62 | CAGGAGGCACGGCAgatACGCAGACTC<br>TGG         | qc мутагенные праймеры<br>для изменения N459<br>AAV8 в D |
| SED ID NO: 63 | CCAGAGTCTGCGTATCTGCCGTGCCTC<br>CTG         | qc мутагенные праймеры<br>для изменения N459<br>AAV8 в D |
| SED ID NO: 64 | ctcctcccgatgtcgcgttgagatttgc               | AAV8 NA263 F                                             |
| SED ID NO: 65 | gcaaattccaacgcgacatcgggaggag               | AAV8 NA263 R                                             |
| SED ID NO: 66 | cccacggcctgactagcgttggtgagtgtta            | AAV8 NA385 F                                             |
| SED ID NO: 67 | Taacactcaacaacgctagtcaggccgtggg            | AAV8 NA385 R                                             |
| SED ID NO: 68 | ggattagccaatgaatttcttcattcagatggtatttggtcc | AAV8 NA514 F                                             |
| SED ID NO: 69 | ggaccaaataccatctgaatgaagaaattcattggctaacc  | AAV8 NA514 R                                             |
| SED ID NO: 70 | tttgcaaaaatcaggatcgcgttactgggaaaaaacg      | AAV8 NA540 F                                             |
| SED ID NO: 71 | cgttttttcccagtaacgcgacatctgatttttgcaaa     | AAV8 NA540 R                                             |
| SED ID NO: 72 | ggacccttcaacgcactcgacaagggg                | AAV8 NA57 F                                              |
| SED ID NO: 73 | ccccttgctgagtgcggtgaagggtcc                | AAV8 NA57 R                                              |
| SED ID NO: 74 | tggctcctcccgatgtgctgttgagatttgcttg         | AAV8 NS263 F                                             |

|               |                                                    |                              |
|---------------|----------------------------------------------------|------------------------------|
| SED ID NO: 75 | caagcaaatctccaacagcacatcgggaggagcca                | AAV8 NS263 R                 |
| SED ID NO: 76 | cccacggcctgactactgttgtgagtgttagg                   | AAV8 NS385 F                 |
| SED ID NO: 77 | cctaactcaacaacagtagtcaggccgtggg                    | AAV8 NS385 R                 |
| SED ID NO: 78 | ttagccaatgaatttctgctattcagatggatttgggtcccagcag     | AAV8 NS514 F                 |
| SED ID NO: 79 | ctgctgggaccaaataccatctgaatagcagaaattcattggct<br>aa | AAV8 NS514 R                 |
| SED ID NO: 80 | ttgtttgccaaaaatcaggatgctgttactgggaaaaaacgctc       | AAV8 NS540 F                 |
| SED ID NO: 81 | gagcgttttttcccagtaacagcatcctgatttttggaacaaa        | AAV8 NS540 R                 |
| SED ID NO: 82 | ctccccctgtcagggtgtgaaggggtccgag                    | AAV8 NS57 F                  |
| SED ID NO: 83 | ctcggacccttcaacagcctcgacaagggggag                  | AAV8 NS57 R                  |
| SED ID NO: 84 | cagcgactcatcaacGACaactggggattccg                   | QC праймер для N305D<br>AAV8 |
| SED ID NO: 85 | ggaggcacggcaGATacgcagactctgg                       | QC праймер для N459D<br>AAV8 |
| SED ID NO: 86 | gacaaccgggcaaaacGACaatagcaactttgcctg               | QC праймер для N499D<br>AAV8 |
| SED ID NO: 87 | ccatctgaatggaagaGATtcattggctaactcctggcatc          | QC праймер для N517D<br>AAV8 |
| SED ID NO: 88 | cgaagcccaaagccGACcagcaaaagcagg                     | QC праймер для N35D<br>AAV8  |
| SED ID NO: 89 | gtacctgcggtatGACcagcccgacgcc                       | QC праймер для N94D<br>AAV8  |
| SED ID NO: 90 | gatgctgagaaccggcGACaactccagtttacttac               | QC праймер для N410D<br>AAV8 |
| SED ID NO: 91 | cagactctgggcttcagcGATggtgggcctaataacaatg           | QC праймер для Q467D<br>AAV8 |
| SED ID NO: 92 | ccaatcaggcaaagGACtggtgccaggac                      | QC праймер для N479D<br>AAV8 |
| SED ID NO: 93 | cacggacggcGACttccaccctctc                          | QC праймер для N630D<br>AAV8 |
| SED ID NO: 94 | gatcctgatcaagGACacgcctgtacctgcg                    | QC праймер для N653D<br>AAV8 |
| SED ID NO: 95 | gtacctcggacccttcCAGggactcgacaaggg                  | QC праймер для N57Q<br>AAV8  |

|                |                                          |                                                                                   |
|----------------|------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| SED ID NO: 96  | ctacaagcaaatctccCAGgggacatcgggaggagc     | QC праймер для N263Q AAV8                                                         |
| SED ID NO: 97  | gctacctaactcaacCAGggtagtcaggccgtgg       | QC праймер для N385Q AAV8                                                         |
| SED ID NO: 98  | gctgggaccaaataccatctgCAGggaagaattcattggc | QC праймер для N514Q AAV8                                                         |
| SED ID NO: 99  | ggagcgttttttcccagtCAGgggacatcgtttttggc   | QC праймер для N540Q AAV8                                                         |
| SED ID NO: 100 | cggaatccccagttgtcgttgatgagtcgctg         | QC праймер для N305D AAV8                                                         |
| SED ID NO: 101 | ccagagtctgcgtatctgccgtgcctcc             | QC праймер для N459D AAV8                                                         |
| SED ID NO: 102 | caggcaaagttgctattgtcgttttggccggttgc      | QC праймер для N499D AAV8                                                         |
| SED ID NO: 103 | gatgccaggattagccaatgaatctcttcattcagatgg  | QC праймер для N517D AAV8                                                         |
| SED ID NO: 104 | cctgctttgctggtcggctttgggcttcg            | QC праймер для N35D AAV8                                                          |
| SED ID NO: 105 | ggcgtcggcgtggtcataccgcaggtac             | QC праймер для N94D AAV8                                                          |
| SED ID NO: 106 | gtaagtaaaactggaagttgtcggcgttctcagcatc    | QC праймер для N410D AAV8                                                         |
| SED ID NO: 107 | cattgtattaggcccaccatcgctgaagcccagagtctg  | QC праймер для Q467D AAV8                                                         |
| SED ID NO: 108 | gtcctggcagccagtcctttgcctgattgg           | QC праймер для N479D AAV8                                                         |
| SED ID NO: 109 | gagacgggtggaagtcgccgtccgtg               | QC праймер для N630D AAV8                                                         |
| SED ID NO: 110 | cgcaggtacaggcgtgccttgatcaggatc           | QC праймер для N653D AAV8                                                         |
| SED ID NO: 111 | gcagcgactcatcaacGACaactggggattccggc      | Альтернативный более длинный праймер для получения N305D AAV8 путем qc мутагенеза |

|                   |                                                  |                                                                                             |
|-------------------|--------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|
| SED ID NO:<br>112 | GCCGGAATCCCCAGTTGTCGTTGATGA<br>GTCGCTGC          | Альтернативный более<br>длинный праймер для<br>получения N305D AAV8<br>путем qc мутагенеза  |
| SED ID NO:<br>113 | cagcgactcatcaacGACaactggggattccggc               | Альтернативный более<br>длинный праймер для<br>получения N305D AAV8<br>путем qc мутагенеза  |
| SED ID NO:<br>114 | GCCGGAATCCCCAGTTGTCGTTGATGA<br>GTCGCTG           | Альтернативный более<br>длинный праймер для<br>получения N305D AAV8<br>путем qc мутагенеза  |
| SED ID NO:<br>115 | gcgactcatcaacGACaactggggattccg                   | Альтернативный более<br>короткий праймер для<br>получения N305D AAV8<br>путем qc мутагенеза |
| SED ID NO:<br>116 | CGGAATCCCCAGTTGTCGTTGATGAGT<br>CGC               | Альтернативный более<br>короткий праймер для<br>получения N305D AAV8<br>путем qc мутагенеза |
| SED ID NO:<br>117 | ctctgggcttcagcGAAGgtgggcctaatac                  | Мутагенный QC праймер<br>для получения Q467E<br>AAV8                                        |
| SED ID NO:<br>118 | GTATTAGGCCACCTTCGCTGAAGCCC<br>AGAG               | Мутагенный QC праймер<br>для получения Q467E<br>AAV8                                        |
| SED ID NO:<br>119 | cctcggacccttcGACggactcgacaagg                    | QC праймер для N57D<br>AAV8                                                                 |
| SED ID NO:<br>120 | tacaagcaaattctccGACgggacatcgggaggag              | QC праймер для N263D<br>AAV8                                                                |
| SED ID NO:<br>121 | ctacctaactcaacGACggtagtcaggccgtg                 | QC праймер для N385D<br>AAV8                                                                |
| SED ID NO:<br>122 | ctgggaccaataccatctgGATggaagaaattcattggcta<br>atc | QC праймер для N514D<br>AAV8                                                                |

|                   |                                                |                              |
|-------------------|------------------------------------------------|------------------------------|
| SED ID NO:<br>123 | gagcggttttttcccagtGACgggacctgatttttggc         | QC праймер для N540D<br>AAV8 |
| SED ID NO:<br>124 | ccttgctgagtcgcgcgaagggtccgagg                  | QC праймер для N57D<br>AAV8  |
| SED ID NO:<br>125 | ctcctcccgatgtcccgtcggagatttgcttgta             | QC праймер для N263D<br>AAV8 |
| SED ID NO:<br>126 | cacggcctgactaccgtcgttgagtgttaggtag             | QC праймер для N385D<br>AAV8 |
| SED ID NO:<br>127 | gattagccaatgaattttcttccatccagatggtatttggtcccag | QC праймер для N514D<br>AAV8 |
| SED ID NO:<br>128 | gccaaaaatcaggatcccgtcactgggaaaaaacgctc         | QC праймер для N540D<br>AAV8 |

### В. Результаты

AAV8 демонстрирует значительную гетерогенность заряда в своих капсидных белках.

Чтобы качественно оценить наличие посттрансляционных модификаций капсида вектора AAV8, которые могут повлиять на производительность вектора, мы проанализировали общий капсидный белок AAV8, очищенный градиентом йодиксанола, с помощью 1D и 2D гель-электрофореза. В 1D восстанавливающем SDS геле додецилсульфата натрия VP1, VP2 и VP3 расходятся как отдельные полосы с соответствующими молекулярными массами (ФИГ. 1B) (Rose JA, et al. J Virol 1971; 8(5):766-70). При дальнейшей оценке с помощью 2D-гель-электрофореза, который разделяет белки на основе заряда (ФИГ. 1C), каждый из капсидных белков дополнительно разделился в виде серии отдельных пятен с разными изоэлектрическими точками (pI) в диапазоне от pH 6,3 до более 7,0 в зависимости от изоформы VP (ФИГ. 1D). Отдельные пятна на каждом VP были разделены дискретными интервалами в 0,1 изоэлектрических точек, что измерялось как миграция относительно стандартов внутренней изоэлектрической точки изоформы карбоангидразы, что свидетельствует об изменении заряда одного остатка. Присутствие этих изоформ указывает на то, что каждый VP обладает потенциалом подвергаться множеству модификаций, тем самым заставляя их мигрировать по-разному при изоэлектрическом фокусировании.

Дезамидирование, при котором часть амидных групп боковой цепи (обычно аспарагина) превращается в карбоновую кислоту (ФИГ. 1A), является обычным источником неоднородности заряда в белковых препаратах. Чтобы определить, может ли дезамидирование быть ответственным за отдельную популяцию изоформ заряда VP, мы по отдельности мутировали два остатка аспарагина AAV8 в аспартат. Эти мутации капсида должны сдвигать заряд на величину, эквивалентную полному дезамидированию одного дополнительного остатка аспарагина. 2D гель-анализ мутантов показывает, что

основные пятна для VP1, VP2 и VP3 сдвинуты на одно место для пятна в более кислое (0,1 единицы pH), чем эквивалентные пятна в AAV8 дикого типа (wt) (ФИГ. 1E - ФИГ. 1G). Величина этого сдвига эквивалентна наблюдаемому интервалу между изоформами заряда VP wt. Таким образом, формирование паттерна капсидных белков AAV в 2D-геле согласуется с многосайтовым дезамидированием.

Спонтанное дезамидирование происходит на капсиде вектора AAV8.

Чтобы идентифицировать модификации, ответственные за дискретный образец пятен для каждого капсидного белка, мы проанализировали панель векторов AAV8 с помощью масс-спектрометрии. Покрытие капсидного белка AAV8 в среднем составляло более 95% от общей последовательности VP1 (данные не показаны). Мы обнаружили обширное дезамидирование подмножества остатков аспарагина и глутамина с помощью масс-спектропии, которая показала увеличение на приблизительно 1 Да наблюдаемой массы индивидуальных пептидов по сравнению с предсказанными значениями, основанными на последовательности, кодируемой ДНК; мы наблюдали этот образец дезамидирования во всех препаратах векторов AAV8 (ФИГ. 2A - ФИГ. 2D).

Чтобы оценить глобальную гетерогенность дезамидирования между обычно используемыми способами очистки и изучить дезамидирование в уникальных областях VP1 и VP2, мы выбрали девять партий AAV8, продуцируемых тройной трансфекцией в клетках 293, и очистили их с помощью градиента хлорида цезия, градиента йодиксанола или аффинной хроматографии. Векторы также различались в отношении промоторов и кассет транскрипции. Чтобы определить, влияет ли присутствие векторного генома на дезамидирование, мы также оценили препарат AAV8, полученный тройной трансфекцией в клетках 293 в отсутствие цис-плазмиды (продуцирующий только пустые капсиды) и очищенный градиентом йодиксанола.

В остатках аспарагина и глутамина капсида AAV8 присутствовал широкий диапазон дезамидирования, от неопределяемого до более 99% дезамидированных отдельных аминокислот (ФИГ. 2E). Наивысшие уровни дезамидирования (> 75%) наблюдались у остатков аспарагина, где остаток N+1 представлял собой глицин (то есть пары NG) (таблица 1). Мы обнаружили более низкие уровни дезамидирования (т.е. до 17%) на дополнительных остатках аспарагина, где N+1 не был глицином. Среднее значение дезамидирования аспарагинов в разных препаратах было в основном одинаковым. Мы также обнаружили дезамидирование по остаткам глутамина, но с меньшей частотой, чем по аспарагинам; самый высокий процент, который мы наблюдали, был менее 2% в Q467 (ФИГ. 7). Это наблюдение не соответствовало различным препаратам (данные не показаны). Мы наблюдали наибольшие различия между препаратами в остатке N499 (остаток N+1 представляет собой аспарагин) со значениями в диапазоне от менее 1% до более 50% дезамидирования. Несмотря на это, наблюдаемые нами вариации дезамидирования между препаратами вектора, по-видимому, не связаны со способом очистки, идентичностью транскрипта или присутствием генома вектора, что позволяет предположить, что эти факторы не влияют на скорость дезамидирования.

Таблица 1: Характеристики представляющих интерес дезамидированных остатков AAV8. Звездочки обозначают остатки, выбранные для дальнейшего анализа.

|       | N+1<br>остаток | Структурная<br>топология          | Структурный<br>мотив | Средний %<br>дезамидирования | Температурный<br>фактор ( $\text{\AA}^2$ ) |
|-------|----------------|-----------------------------------|----------------------|------------------------------|--------------------------------------------|
| N35   | Q              | Сведений нет                      | Сведений нет         | 1                            | Сведений нет                               |
| N57   | G              | Сведений нет                      | Сведений нет         | 80                           | Сведений нет                               |
| N94   | H              | Сведений нет                      | Сведений нет         | 7                            | Сведений нет                               |
| N254* | N              | Экспонированный<br>на поверхности | Не назначен          | 9                            | 35                                         |
| N255* | H              | Экспонированный<br>на поверхности | Не назначен          | Сведений нет                 | 42                                         |
| N263  | G              | Экспонированный<br>на поверхности | HVR I                | 99                           | 51                                         |
| N305  | N              | Скрытый                           | Альфа спираль        | 8                            | 33                                         |
| N385  | G              | Экспонированный<br>на поверхности | HVR III              | 88                           | 41                                         |
| N410  | N              | Скрытый                           | Не назначен          | 3                            | 33                                         |
| N459  | T              | Экспонированный<br>на поверхности | HVR IV               | 7                            | 65                                         |
| N499  | N              | Экспонированный<br>на поверхности | HVR V                | 17                           | 45                                         |
| N514* | G              | Экспонированный<br>на поверхности | HVR V                | 84                           | 36                                         |
| N517* | S              | Экспонированный<br>на поверхности | HVR V                | 4                            | 40                                         |
| N540* | G              | Скрытый                           | HVR VII              | 79                           | 40                                         |
| N630* | F              | Скрытый                           | Не назначен          | 1                            | 32                                         |
| N653  | T              | Экспонированный<br>на поверхности | HI петля             | 1                            | 35                                         |

Далее мы провели серию экспериментов, чтобы определить, влияет ли обработка образцов на наблюдаемые уровни дезамидирования в AAV8. Экстремальная температура ( $70^{\circ}\text{C}$  в течение 7 дней) или pH (pH 2 или pH 10 в течение 7 дней) не вызывали значительного дополнительного дезамидирования в капсиде AAV8 (ФИГ. 4А и ФИГ. 4В). Учитывая эту устойчивость, мы полагаем, что маловероятно, чтобы наблюдаемое дезамидирование происходило только на этапе очистки, который был более коротким и

относительно мягким по сравнению с этим. Мы попытались провести масс-спектрометрический анализ на неочищенном векторе, чтобы определить степень дезамидирования до и после очистки, но безуспешно. Аналогичным образом, контроли тяжелой воды показывают, что обработка, специфичная для нашего рабочего процесса масс-спектрометрии, не вносит дополнительных событий дезамидирования (ФИГ. 4С).

Чтобы подтвердить наш рабочий процесс масс-спектрометрии, мы исследовали два рекомбинантных белка, которые ранее были оценены на предмет дезамидирования; наши выводы (ФИГ. 5А и ФИГ. 5В) согласуются с опубликованными результатами [Henderson, LE, Henriksson, D, and Nyman, PO (1976). Primary structure of human carbonic anhydrase C. *The Journal of biological chemistry* 251: 5457-5463 и Carvalho, RN, Solstad, T, Bjorgo, E, Barroso, JF, and Flatmark, T (2003). Deamidations in recombinant human phenylalanine hydroxylase. Identification of labile asparagine residues and functional characterization of Asn --> Asp mutant forms. *The Journal of biological chemistry* 278: 15142-1515]. Кроме того, мы привлекли вторичное учреждение для оценки наших необработанных данных из AAV8. Этот независимый анализ выявил те же сайты, как дезамидированные, с минимальными вариациями в степени модификации на каждом сайте, что связано с межпрограммными изменениями в обнаружении пиков и вычислении площади (ФИГ. 6).

Структурная топология, температурный фактор и идентичность аминокислоты N+1 влияют на частоту дезамидирования.

Поскольку структура AAV8 была расшифрована и опубликована (идентификатор PDB: 2QA0) (Nam HJ, et al. *J Virol* 2011; 85 (22): 11791-99), мы затем исследовали структуру капсида AAV8 для доказательства благоприятных условий для неферментативного дезамидирования и для корреляции процента дезамидирования с установленными структурными особенностями (Nam HJ, et al. *J Virol* 2007; 81(22):12260-71). Мы сосредоточили внимание исключительно на остатках аспарагина, поскольку факторы, влияющие на дезамидирование аспарагина, лучше описаны в литературе, а события дезамидирования аспарагина гораздо более распространены, чем события дезамидирования глутамина (Robinson, NE, and Robinson, AB (2001). *Molecular clocks. Proc Natl Acad Sci USA* 98: 944-949). Мы также определили температурный (или В) фактор для каждого из этих остатков из кристаллической структуры AAV8; температурный фактор представляет собой меру смещения атома от его среднего положения, причем более высокие значения указывают на большее смещение, более высокую тепловую вибрацию и, следовательно, повышенную гибкость (Parthasarathy S and Murphy MR. *Protein Science: A Publication of the Protein Society* 1997; 6:2561-7). Большинство представляющих интерес аспарагинов располагались внутри или рядом с HVR, экспонированными на поверхности (таблица 1), которые структурно благоприятны для дезамидирования и обеспечивают среду, подверженную воздействию растворителя (Govindasamy L, et al. *J Virol* 2013; 87(20):11187-99). Мы обнаружили, что остатки, расположенные в этих областях гибкой петли, в среднем дезамидируются чаще, чем

остатки в менее гибких областях, таких как бета-цепи и альфа-спирали. Например, остаток NG в позиции N263 является частью HVR I, имеет высокий температурный фактор и в среднем дезамидирован на более 98% (фиг. 7А и ФИГ. 6, Таблица 1). N514, который дезамидировался приблизительно 85% времени (ФИГ. 3 и Фиг. 6, таблица 1), также находится в HVR (HVR V) с N+1 глицином; однако местный температурный фактор относительно низок по сравнению с фактором N263 из-за его взаимодействия с остатками на других мономерах VP на тройной оси. Менее благоприятные остатки +1 и более низкие местные температурные факторы коррелировали с более низким дезамидированием даже для остатков HVR. Например, N517 в среднем дезамидирован только на 4% (Таблица 1); этот остаток имеет температурный фактор, эквивалентный сильно дезамидированному N514, но его остаток N+1 представляет собой серин, что снижает вероятность событий дезамидирования из-за стерических затруднений. Это демонстрирует, что ряд факторов кумулятивно определяют степень дезамидирования в данной позиции капсида, хотя идентичность остатка +1, по-видимому, является наиболее влиятельным фактором.

Чтобы проверить роль остатка +1 в дезамидировании аспарагина, мы создали мутантные векторы, в которых сайты AAV8 NG были отдельно мутированы в позиции +1 либо на аланин, либо на серин. Исследования модельных пептидов показывают, что пептиды NG дезамидируются с периодом полужизни всего 1 день, тогда как пептиды NA или NS обычно дезамидируются в 25 или 16 раз медленнее, соответственно (Robinson NE and Robinson AB. Proc Natl Acad Sci USA. 2001; 98(8):4367-72). Масс-спектрометрический анализ векторных мутантов подтвердил центральную роль +1 сайта в определении степени дезамидирования вектора. Сайты NG в этом наборе (более 80% дезамидирования в массе) показали селективную стабилизацию соседнего аспарагина, когда сайт +1 был изменен на аланин (менее 5% дезамидирования) или серин (менее 14% дезамидирования) (Таблица 2).

Таблица 2: Степень дезамидирования (%) по пяти сайтам NG AAV8 в wt и шести сайтам-мутантам по +1

| позиция\вариант | WT (в среднем) | G58S  | G58A | G264A | G386S | G386A | G515A |
|-----------------|----------------|-------|------|-------|-------|-------|-------|
| N57             | 81,8           | 8,4   | 1,9  | 89,7  | 89,7  | 91,6  | 93,6  |
| N263            | 99,3           | 98,2  | 98,9 | 4,8   | 100,0 | 94,5  | 97,2  |
| N385            | 89,1           | 96,3  | 94,8 | 97,1  | 13,5  | 2,5   | 97,0  |
| N514            | 85,2           | 100,0 | 98,0 | 98,8  | 100,0 | 100,0 | 2,2   |
| N540            | 84,5           | 95,0  | 92,6 | 97,9  | 96,9  | 86,1  | 89,5  |

Остатки, которые были, по меньшей мере частично, скрыты и не легко подвергались воздействию растворителя и/или находились в областях с низкой локальной гибкостью в неповрежденном, полностью собранном капсиде AAV8, имели более низкую частоту дезамидирования по сравнению с теми, которые расположены в более благоприятной для этого окружающей среде (Таблица 1). Несмотря на это, некоторые остатки в неблагоприятных условиях были дезамидированы. Например, N630 по меньшей

мере частично скрытый, но все же имеет достаточную для обнаружения степень дезамидирования. Для этого остатка присутствие фенилаланина в качестве остатка N+1 предполагает, что эта область может быть новым сайтом неферментативного автопротеолитического расщепления в белке VP3 AAV8.

Структурное моделирование VP3 AAV8 подтверждает события дезамидирования

Чтобы предоставить прямые доказательства дезамидирования в контексте собранного капсида, мы оценили кристаллическую структуру AAV8 (Nam H-J, et al. *J Virol* 2011; 85(22):11791-9). Разрешение доступной кристаллической структуры (т.е. 2,7 Å) этого серотипа недостаточно высоко для идентификации концевых атомов в группах R и, следовательно, недостаточно для прямого различения остатков аспарагина, аспарагиновой и изоаспарагиновой кислот. Другие аспекты структуры изомера аспарагиновой кислоты, которая образуется в этих условиях, предоставили нам возможность определить дезамидирование по структуре 2,7Å. Этот анализ был основан на двух предположениях: 1) Преобладающим продуктом спонтанного дезамидирования аспарагина является изоаспарагиновая, а не аспарагиновая кислота, которая образуется в соотношении 3:1 (Geiger T. and Clarke S.J *Biol Chem* 1987; 262 (2): 785-94), и 2) аспарагин или аспарагиновая кислота могут отличаться от изоаспарагиновой кислоты, потому что карта электронной плотности, соответствующая группе R изоаспарагиновой кислоты, короче по длине. Эта более короткая группа R образуется, когда бета-углерод из группы R изоаспарагиновой кислоты теряется при включении в основную цепь каркаса капсидного белка VP3 AAV8 после разделения сукцинимидилового промежуточного соединения во время реакции дезамидирования.

Сначала мы усовершенствовали саму структуру AAV8, генерируя электронную плотность капсида AAV8, которая не была искажена известной последовательностью VP3 AAV8. Затем мы исследовали уточненную кристаллическую структуру AAV8 на предмет наличия дезамидирования на основе присутствия более короткой группы R, связанной с изоаспарагиновой кислотой (ФИГ. 3А - ФИГ. 3Е). Карта электронной плотности подтвердила наличие более короткой группы R для сильно дезамидированных остатков глицина N+1 в позициях 263 (фиг. 3С), 385 (не показано), 514 (ФИГ. 3D) и 540 (ФИГ. 3Е) по сравнению с аспарагином на 410, в котором не было дезамидирования, обнаруженного масс-спектрометрией (ФИГ. 3В). Таким образом, дезамидирование, указанное на карте электронной плотности, согласуется с данными, полученными с помощью масс-спектрометрии на этих участках с более 75% дезамидирования. Полученные модели изоаспарагиновой кислоты были сопоставимы с остатками изоаспарагиновой кислоты, наблюдаемыми в кристаллических структурах других известных дезамидированных белков, что подтверждает достоверность нашего анализа AAV8 (Rao FV, et al. *Chem Biol*. 2005; 12(1):65-76; Noguchi S, et al. *Biochemistry* 1995; 34(47):15583-91; Esposito L, et al. *J Mol Biol* 2000; 297(3):713-32). Этот структурный анализ служит независимым подтверждением явления дезамидирования, наблюдаемого при анализе капсида AAV8 с помощью масс-спектрометрии.

Дезамидирование капсида AAV не зависит от серотипа

Мы исследовали серотипы за пределами AAV8 для доказательства дезамидирования капсида. Мы исследовали препараты вектора AAV9 с помощью 2D-гель-электрофореза (ФИГ. 11A) и масс-спектрометрии (ФИГ. 11B), включая контроли для потенциальных эффектов обработки векторов (ФИГ. 11D - ФИГ. 11F). Паттерн и степень дезамидирования AAV9 были аналогичны таковым для AAV8. Все четыре сайта AAV9 NG были дезамидированы на более 85%; 13 участков, не являющихся NG, были дезамидированы в меньшей степени, при этом несколько участков показали высокую вариабельность процента дезамидирования от партии к партии. Затем мы применили наш рабочий процесс структурного анализа и обновили существующие кристаллографические данные AAV9 (ФИГ. 11C, таблица 3). Как и AAV8, изоаспарагиновая кислота лучше соответствует электронной плотности нескольких сайтов NG в кристаллической структуре AAV9. Мы расширили наш 2D гель-анализ (данные не показаны) и масс-спектрометрию (обобщены в таблице 4) на пять дополнительных эволюционно различных серотипов (rh32.33, AAV7, AAV5, AAV4, AAV3B и AAV1). Все исследованные капсиды содержат сходный паттерн и степень дезамидирования, что указывает на то, что эта модификация широко распространена в клинически значимых векторах AAV и определяется сходными лежащими в основе первичной последовательностью и структурными факторами.

Таблица 3. Характеристики представляющих интерес дезамидированных остатков AAV9.

Консервативные остатки аспарагина с гомологичными остатками N+1 (по сравнению с AAV8) выделены курсивом (определено выравниванием полноразмерных аминокислотных последовательностей VP1 AAV8 и AAV9).

|      | N+1<br>остаток | Структурная<br>топология          | Структурный<br>мотив | Средний<br>дезамидирования | %<br>Температурный<br>фактор ( $\text{\AA}^2$ ) |
|------|----------------|-----------------------------------|----------------------|----------------------------|-------------------------------------------------|
| N57  | G              | Сведений нет                      | Сведений нет         | 97                         | Сведений нет                                    |
| N94  | H              | Сведений нет                      | Сведений нет         | 5                          | Сведений нет                                    |
| N253 | N              | Экспонированный<br>на поверхности | Не назначен          | 9                          | 41                                              |
| N254 | H              | Экспонированный<br>на поверхности | Не назначен          | 2                          | 50                                              |
| N270 | D              | Экспонированный<br>на поверхности | HVR I                | 11                         | 65                                              |
| N304 | N              | Скрытый                           | Альфа спираль        | 23                         | 35                                              |
| N329 | G              | Экспонированный<br>на поверхности | HVR II               | 94                         | 89                                              |
| N409 | N              | Скрытый                           | Не назначен          | 9                          | 36                                              |

|      |   |                                   |             |    |    |
|------|---|-----------------------------------|-------------|----|----|
| N452 | G | Экспонированный<br>на поверхности | HVR IV      | 98 | 64 |
| N477 | Y | Скрытый                           | Не назначен | 2  | 33 |
| N512 | G | Экспонированный<br>на поверхности | HVR V       | 89 | 48 |
| N515 | S | Экспонированный<br>на поверхности | HVR V       | 3  | 47 |
| N651 | T | Скрытый                           | HI петля    | 1  | 38 |
| N663 | K | Экспонированный<br>на поверхности | HI петля    | 4  | 49 |
| N668 | S | Экспонированный<br>на поверхности | HI петля    | 13 | 52 |
| N704 | Y | Экспонированный<br>на поверхности | HVR IX      | 5  | 68 |
| N709 | N | Экспонированный<br>на поверхности | HVR IX      | 5  | 55 |

Таблица 4. Степень дезамидирования, наблюдаемая для различных серотипов

| серотип | проанализированные векторные препараты | Средний % покрытия последовательности с помощью MC | # N G | средний % дезамидирования NG | # наблюдаемых дезамидированных сайтов, не являющихся NG | средний % дезамидирования не являющихся NG |
|---------|----------------------------------------|----------------------------------------------------|-------|------------------------------|---------------------------------------------------------|--------------------------------------------|
| AAV1    | 3                                      | 91,4                                               | 4     | 95,6                         | 19                                                      | 12,9                                       |
| AAV3    | 1                                      | 89,8                                               | 4     | 97,0                         | 9                                                       | 9,4                                        |
| AAV4    | 3                                      | 84,7                                               | 4     | 96,2                         | 15                                                      | 15,3                                       |
| AAV5    | 1                                      | 88,7                                               | 3     | 88,7                         | 11                                                      | 15,3                                       |
| AAV7    | 1                                      | 90,9                                               | 4     | 92,1                         | 9                                                       | 13                                         |
| AAV8    | 21                                     | 93,4                                               | 5     | 90,5                         | 37                                                      | 7,4                                        |
| AAV9    | 7                                      | 90,2                                               | 4     | 95,5                         | 26                                                      | 5,3                                        |
| rh32.3  | 1                                      | 100                                                | 3     | 97,4                         | 14                                                      | 16,2                                       |

События дезамидирования могут повлиять на сборку капсида и эффективность трансдукции.

Один из подходов к тестированию функционального воздействия дезамидирования заключается в замене аспарагина на аспартат в результате генетической мутации. Мы создали мутантный по аспартату вектор, кодирующий репортер люциферазы для каждого дезамидированного аспарагина AAV8, путем маломасштабной тройной трансфекции клеток 293, и титровали векторы с помощью кПЦР копий генома, устойчивых к ДНКзе I

(ФИГ. 8А). Мутации редко влияли на сборку капсида по сравнению с wtAAV8, а эффекты были ограничены в основном скрытыми, не являющимися NG сайтами с низким общим дезамидированием в векторе wt. Затем мы оценили панель мутаций на эффективность трансдукции *in vitro* клеток Huh7, полученных из печени человека (ФИГ. 8В). Несколько мутантов показали сниженную эффективность трансдукции, при этом позиции N57, N94, N263, N305, Q467, N479 и N653 демонстрируют более, чем 10-кратную потерю трансдукции. Мы наблюдали подобное количество чувствительных сайтов для AAV9 (ФИГ. 11G и ФИГ. 11H). Поскольку обычно только часть остатков в данной позиции дезамидируется эндогенно, этот подход может переоценить функциональную потерю белков, таких как в капсидах, где функциональная единица представляет собой гомомерный комплекс; эндогенная модификация в одном сайте капсида может быть компенсирована соседней субъединицей с интактным остатком. Тем не менее, мы пришли к выводу, что этот способ может помочь установить приоритетные дезамидированные остатки для будущего мониторинга во время производства или мутационной стабилизации. Функциональные данные из популяций эндогенно дезамидирующих векторов потребуются, чтобы поместить эти данные мутагенеза с потерей функции в надлежащий контекст.

Потеря активности векторов с течением времени коррелирует с прогрессирующим дезамидированием

Учитывая явно короткий период полужизни дезамидирования NG, мы пришли к выводу, что образцы векторов, различающиеся по возрасту всего на 1 день, могут иметь различные профили дезамидирования, что дает возможность коррелировать с функцией эндогенного дезамидирования. Наш крупномасштабный протокол подготовки вектора предусматривает тройную трансфекцию клеток 293 с последующими 5 днями инкубации для получения вектора и 1-2 днями для очистки вектора. Чтобы приблизить этот процесс, мы подготовили тройную трансфекцию в среднем масштабе (чашки для культивирования клеток 10×15 см каждая) клеток 293 с диким типом AAV8. Мы собирали вектор (2 чашки для культивирования клеток по 15 см в день) с интервалом в 1 день в течение 5 дней, сохраняя временные точки до конца 5-дневного периода путем замораживания вектора при минус 80°C. Затем мы оценили титр неочищенного вектора и эффективность трансдукции *in vitro*, как описано выше. Как и ожидалось, количество собранных, устойчивых к ДНКзе I копий генома со временем увеличивалось (ФИГ. 9А). Затем мы быстро обработали неочищенный вектор для ранних (день 1 и 2) и поздних (день 5) моментов времени с помощью аффинной очистки и измерили эффективность трансдукции *in vitro* клеток huh7. Относительная эффективность трансдукции вектора со временем постепенно снижалась (ФИГ. 9В). Что касается экспрессии трансгена на каждый GC, добавленный к клеткам-мишеням, вектор 5-го дня был только на 40% более эффективнее, чем материал 1-го дня. Это падение активности наблюдалось также для неочищенного материала, что указывает на изменение молекулярного состава перед очисткой (ФИГ. 9С). Мы наблюдали аналогичную тенденцию потери активности для AAV9 в течение 5 дней с

приблизительно 40% снижением эффективности вектора (ФИГ. 11I - ФИГ. 11K).

Затем мы измерили дезамидирование образцов в зависимости от времени с помощью масс-спектрометрии. Дезамидирование NG-сайтов существенно прогрессировало в каждом интервале, в среднем 25% дезамидирования в день 1 и более 60% сайтов, превращенных в день 5 (ФИГ. 9C). Дезамидирование не-NG сайтов обычно прогрессировало в течение 5 дней, хотя и на гораздо более низких уровнях и с меньшей согласованностью между 2 и 5 днями (ФИГ. 9D). Данные демонстрируют корреляцию дезамидирования эндогенного вектора со снижением специфической активности в ранний момент времени и подчеркивают потенциальную возможность захвата более активного вектора путем сокращения производственного цикла или обнаружения мутаций капсида, которые стабилизируют аспарагин.

Следует отметить, что материал, используемый для масс-спектрометрического анализа на ФИГ. 2A - ФИГ. 2E был по меньшей мере через 7 дней после трансфекции из-за дополнительных 2 дней для очистки. Более высокое дезамидирование сайтов NG в этих образцах (> 80%) указывает на то, что дезамидирование, вероятно, продолжается после периода экспрессии и во время процессов восстановления и очистки приблизительно с той же скоростью, пока сайты NG не будут полностью дезамидированы или образец вектора не заморожен. Таким образом, дезамидирование во многом определяется возрастом вектора и не является процессом, который является исключительным или вызванным процессом восстановления и очистки. Значительно более низкие значения дезамидирования в материале 1-го дня по сравнению с материалом 5-го дня (оба очищены сродством) подчеркивают этот момент.

Стабилизация аспарагина NG может улучшить работу векторов

Учитывая корреляцию между дезамидированием NG вектора и потерей эффективности трансдукции, мы пришли к выводу, что стабилизация амидов NG с помощью мутагенеза +1 сайта может улучшить функцию вектора. Мы создали маломасштабный вектор для мутантов AAV8 по сайту NG, в которых каждый +1 остаток индивидуально превращался в аланин или серин. Единичные мутанты +1 хорошо переносились с точки зрения сборки вектора (ФИГ. 10A) и эффективности трансдукции (ФИГ. 10B). Замены G386, расположенные рядом с ранее определенной «мертвой зоной» на поверхности капсида (Aydemir F, et al. J Virol July 2016; 90(16):7196-204), были дефектными для трансдукции *in vitro*. Утрата функции мутантов G386 может указывать на предпочтение дезамидированного аспарагина по N385. Альтернативно, дополнительный объем боковой цепи в положении +1 может оказывать негативное влияние на функцию, которая не зависит от стабилизации амидной группы. Ни один из односайтовых мутантов существенно не улучшил трансдукцию *in vitro*, несмотря на резкую стабилизацию соседних с ними аспарагинов (таблица 2). Поскольку трансдукционные активности *in vitro* и *in vivo* могут быть несовместимыми, мы протестировали подмножество односайтовых +1 мутантов на трансдукцию печени у мышей C57BL/6. Мы провели внутривенную инъекцию в хвостовую вену (n=от 3 до 5) и исследовали экспрессию люциферазы путем

еженедельной визуализации в течение 2 недель (ФИГ. 10C). Данные о трансдукции *in vivo* и *in vitro* согласуются в пределах ошибок, связанных с каждым анализом (то есть в пределах диапазона ошибок). Замены G386 были дефектными для трансдукции, тогда как мутации +1 сайта в других положениях в значительной степени переносились, трансдуцируя печень на уровнях, эквивалентных, но не превышающих wtAAV8.

Поскольку стабилизация амида в любом одном сайте NG может быть необходимой, но недостаточной для функционального восстановления, мы затем оценили варианты вектора с комбинациями замен аланина в +1 сайте. Мы рекомбинировали все 3 сайта NG AAV8, для которых +1 аланин был высокофункциональным (N263, N514 и N540). Некоторые комбинации, в том числе тройной мутант G264A/G515A/G541A, плохо собирались и были дисфункциональными для трансдукции. Однако обе парные комбинации с участием N263 (G246A/G515A и G264A/G541A) улучшили эффективность трансдукции *in vitro* (в 2,0 и 2,6 раза по сравнению с wtAAV8, соответственно) без потери титра (ФИГ. 10D). Поскольку эти мутации вносят по меньшей мере два изменения (стабилизация N-амида и замена +1 остатка боковой цепи), эти данные не окончательно связывают дезамидирование NG с функциональной потерей. Однако эти данные согласуются с моделью, установленной в исследовании временных рамок, в которой дезамидирование сайта NG может влиять на эффективность трансдукции *in vitro*.

Функциональные замены аспарагина улучшают воспроизводимость от партии к партии при производстве векторов

Другим потенциально проблемным аспектом профилей векторного дезамидирования, о которых мы сообщаем, является высокая изменчивость дезамидирования от партии к партии в некоторых позициях. Для wtAAV8 эта изменчивость наиболее выражена для N459 (наблюдаемое дезамидирование в диапазоне от 0% до 31%) и N499 (наблюдаемое дезамидирование в диапазоне от 0% до 53%). Вариабельность посттрансляционных модификаций обычно де-факто избегают во время разработки биопрепаратов, либо полностью избегая клонов, которые демонстрируют эту изменчивость, тщательно отслеживая и контролируя штаммы и условия продуцирования, либо путем белковой инженерии пораженного кандидата.

Поскольку нам не удалось определить факторы производства или обработки, способствующие изменчивости дезамидирования N459 и N499 (ФИГ. 2E) мы искали функциональные аминокислотные замены в этих позициях. Сначала мы оценили небольшие препараты векторов на предмет консервативных замен глутамина в каждом положении индивидуально. И N459Q, и N499Q были эффективно собраны в вектор и были эквивалентны эталону wtAAV8 по эффективности трансдукции *in vitro* (ФИГ. 7A). Затем мы получили мутанты в крупном масштабе и провели масс-спектрометрию. В соответствии с нашими наблюдениями крайне редкого дезамидирования глутамина, мы наблюдали избирательную и полную стабилизацию амидов глутамина в положениях 459 или 499 у этих мутантов (данные не показаны). Мы оценили эти мутантные партии *in vivo*, как указано выше, на предмет трансдукции печени после инъекции в хвостовую вену у

мышей C57BL/6 (ФИГ. 7В и ФИГ. 7С). Партия вектора wtAAV8, использованная в качестве контроля в этом эксперименте, была дезамидирована на 16,8% по N499, но не было обнаружено дезамидирования по N459 (данные не показаны). Трансдукция в печень на 14 день для обоих мутантов была эквивалентна wtAAV8. Эти данные демонстрируют потенциал подхода к инженерии белков для решения молекулярной изменчивости, связанной с дезамидированием в изготовленных векторах AAV.

### С. Обсуждение

Мы идентифицировали и оценили неферментативное дезамидирование остатков аспарагина и глутамина на капсиде AAV8 независимо с помощью 2D-гель-электрофореза, масс-спектрометрии, моделирования белков *de novo* и функциональных исследований как *in vitro*, так и *in vivo*. Было показано, что дезамидирование происходит в большом количестве белков и существенно влияет на активность биопрепаратов, включая терапевтические средства на основе антител (Nebija D et al. *Int J Mol Sci* 2014; 15(4):6399-411) и вакцины на основе пептидов (Verma A et al. *Clin Vaccine Immunol.* 2016; 23(5):396-402). Масс-спектрометрия показала, что другие вирусные белки, такие как белок ротавируса VP6, подвергаются дезамидированию (Emslie KR et al. *Funct Integr Genomics* 2000; 1(1):12-24).

Контекст, в котором эти дезамидирования происходят в AAV8, предполагает, что они являются результатом спонтанных неферментативных событий. Остатки аспарагина, как известно, дезамидированы в большей степени, чем остатки глутамина; аминокислота после аспарагина существенно влияет на скорость дезамидирования, при этом N+1 глицина (т.е. NG) дезамидируется наиболее эффективно. Мы наблюдали значительное подтверждение роли N+1 аминокислоты в дезамидировании капсидов AAV в том, что каждый NG, присутствующий в VP1, был дезамидирован на уровнях более 75%, в то время как дезамидирование никогда не было стабильно на более 20% в любом из других аспарагинов или глутаминов в капсиде. Практически все мотивы NG в капсиде AAV8 и AAV9 (т.е. 7/9) также присутствовали на поверхности капсида, содержащегося в областях HVR, которые связаны с высокими показателями конформационной гибкости и тепловой вибрации. Это согласуется с предыдущими сообщениями о мотивах NG других белков, которые расположены в областях, где для правильного функционирования белка может потребоваться гибкость, а не в более упорядоченных структурах, таких как альфа-спирали или бета-листы (Yan BX and Sun YQ *J Biol Chem* 1997; 272(6):3190-4). Предпочтение мотивов NG в HVR, экспонированных на поверхности, дополнительно увеличивает скорость дезамидирования, обеспечивая доступность растворителя и конформационную гибкость, тем самым облегчая образование промежуточного соединения сукцинимидила. Как и предполагалось, менее благоприятные условия приводят к гораздо более низким показателям дезамидирования.

Важным вопросом, касающимся биологии AAV и его использования в качестве вектора, являются функциональные последствия таких дезамидирований. Мутагенез капсидной ДНК с целью превращения аспарагина в аспарагиновую кислоту позволяет

оценить капсиды, в которых все аминокислоты в определенном месте представлены как аспарагиновые кислоты. Однако не существует простой стратегии использования мутагенеза для предотвращения дезамидирования, кроме потенциальной мутации остатка N+1, что осложняется прямыми последствиями мутации второго сайта. Мы изучили ограниченное количество вариантов, в которых остаток аспарагина был превращен в аспарагиновую кислоту путем мутагенеза. Функциональный анализ включал сборку капсида и трансдукцию *in vitro* и *in vivo*. Наиболее существенные эффекты мутагенеза на функцию вектора были связаны с аспарагинами, которые не были полностью дезамидированы на исходном уровне и не были экспонированными на поверхности. Однако удивительным было то, что мутагенез сильно дезамидированного аспарагина по 514 в аспарагиновую кислоту действительно оказал некоторое влияние на функцию. Этот результат предполагает, что присутствие остаточных количеств соответствующего амида может влиять на функцию. Частично это может быть связано с наличием взаимодействий водородных связей между N514 и D531 другого тройного родственного мономера VP3 (идентифицированного в кристаллической структуре wtAAV8), которые теряются при превращении этого остатка в аспарагиновую кислоту после дезамидирования.

Лучшее понимание факторов, которые влияют на степень дезамидирования в векторах AAV, важно при оценке влияния таких дезамидирований на разработку новых терапевтических средств. Инкубация векторов в экстремальных условиях, которая, как известно, значительно ускоряет кинетику дезамидирования, имела небольшой эффект. В сочетании с нашими исследованиями включения изотопов этот результат предполагает, что дезамидирование происходит во время сборки капсида и не является артефактом векторной обработки или масс-спектрометрического анализа. Дезамидирование на участках NG вряд ли окажет существенное влияние на производительность векторов, поскольку реакция была практически полной в каждом образце, который мы оценивали. Однако наши первоначальные функциональные исследования показывают, что остаточные количества недезамидированного аспарагина могут влиять на функцию. Нас больше беспокоят участки, где дезамидирование было менее полным, что в большинстве случаев также было связано с вариациями от образца к образцу. Примером является аспарагин в положении 499, который показал дезамидирование в диапазоне от 0% до 53% со средним значением 17%. Возможно, что небольшие различия в условиях получения векторов могут способствовать этой неоднородности. Поразительное сходство дезамидирования в AAV8 и AAV9 предполагает, что это свойство всего этого семейства вирусов.

Таким образом, мы обнаружили существенную гетерогенность в первичной аминокислотной структуре капсидных белков AAV8 и AAV9. Эти исследования потенциально влияют на развитие AAV как векторов несколькими способами. Во-первых, действительные аминокислотные последовательности белков VP не соответствуют прогнозам соответствующих последовательностей ДНК. Во-вторых, аспекты способа получения могут привести к вариациям дезамидирования и соответствующим изменениям

векторной функции. До тех пор, пока мы не разберемся с факторами, влияющими на скорость дезамидирования в сайтах, не являющихся NG, и не будем лучше понимать их функциональные последствия, может возникнуть необходимость включения дезамидирования в характеристику векторов AAV клинического уровня. 2D гель-электрофорез может обеспечить общую оценку чистого дезамидирования, хотя для оценки дезамидирования по конкретным остаткам потребуется масс-спектрометрия.

#### ПРИМЕР 2 Дезамидирование AAV5.5.9

Новые последовательности AAV5.5.9 предложены в SEQ ID NO: 9 и 10, соответственно. Векторы AAV5.5.9 оценивали на дезамидирование, как описано в Примере 1 для AAV9. Сильно дезамидированные остатки видны в N57, N319, N442, N502.

| Модификации<br>SEQ ID NO: 10 | WL2019CS |
|------------------------------|----------|
| Фермент                      | Трипсин  |
| % покрытия                   | 97,4     |
| N35+Дезамидирование          | 7,8      |
| ~N57+Дезамидирование         | 99,7     |
| N113+Дезамидирование         | 3,6      |
| ~N204+Дезамидирование        | 13,9     |
| N217+Дезамидирование         | 2,2      |
| ~N243+Дезамидирование        | 19,0     |
| Q249+Дезамидирование         | 11,4     |
| N293/294+Дезамидирование     | 37,3     |
| N304+Дезамидирование         | 6,2      |
| N309+Дезамидирование         | 0,7      |
| Q311+Дезамидирование         | 0,3      |
| ~N319+Дезамидирование        | 83,9     |
| N399/400+Дезамидирование     | 30,8     |
| ~N442+Дезамидирование        | 97,7     |
| N467+Дезамидирование         | 2,6      |
| N502+Дезамидирование         | 100,0    |
| N505+Дезамидирование         | 18,6     |
| ~Q589+Дезамидирование        | 21,1     |
| N618+Дезамидирование         | 6,6      |
| ~N641+Дезамидирование        | 8,1      |
| N653+Дезамидирование         | 8,3      |

|                       |      |
|-----------------------|------|
| ~N658+Дезамидирование | 21,7 |
| N694+Дезамидирование  | 0,6  |
| ~N699+Дезамидирование | 8,6  |

### ПРИМЕР 3: Дезамидирование AAVrh79 (класс E)

AAVrh79 был выделен из ДНК, выделенной из ткани тонкой кишки макаки-резус. Филогенетически он был охарактеризован как находящийся в пределах класса E (ФИГ. 14A-14D). Его последовательности предложены в данном документе, причем нуклеотидные последовательности находятся в SEQ ID NO:1, а аминокислотная последовательность находится в SEQ ID NO:2. Выравнивание аминокислотных последовательностей AAVrh79, AAVrh.10 и AAVhu.37 представлено на ФИГ. 14A. Выравнивание последовательностей нуклеиновой кислоты AAVrh79, AAVrh.10 и AAVhu.37 представлено на ФИГ. 14B-14D.

AAVrh79 имеет три аминокислотных различия в своей первичной последовательности. В то время как AAVhu37 имеет Ala в позиции 67 и Lys в позиции 169 своей первичной последовательности VP1, AAVrh79 имеет глутаминовую кислоту (E) в позиции 67 и Arg в позиции 169. Различия в последовательностях ДНК VP1 среди rh.79, hu.37 и hu.40 показаны на ФИГ. 11B. Были получены векторы, экспрессирующие eGFP на основе различных вариантов класса E, и их оценивали на их относительную инфекционность по отношению к клеткам Huh7 (ФИГ. 11C). Мышам C57BL/6 инъецировали два уровня доз ( $3 \times 10^{10}$  и  $3 \times 10^{11}$  GC/мышь) векторов AAV8 или AAVrh.79, экспрессирующих eGFP, и инфекционность оценивали с помощью флуоресцентной микроскопии (данные не показаны).

Векторы на основе AAVrh79 были получены с использованием известных методов получения с использованием нуклеотидной последовательности AAVrh79 для получения сар, например, как ранее описано для векторов AAV8. Результаты оценки выхода продукции и чистоты продукции представлены на ФИГ. 15A-15B и ФИГ. 16, соответственно.

Для оценки уровней экспрессии с использованием AAVrh79, содержащего маркерный ген (люцифераза светлячка), самцам мышей RAG KO в возрасте 6-8 недель внутримышечно вводили  $3 \times 10^{11}$  GC/мышь вектора, полученного с использованием шприца Hamilton. Экспрессию ffLuc визуализировали с помощью биолюминесцентной визуализации всего тела, как описано ранее [Greig JA, Peng H, Ohlstein J, Medina-Jaszek CA, Ahonkhai O, Mentzinger A, et al. (2014) Intramuscular Injection of AAV8 in Mice and Macaques Is Associated with Substantial Hepatic Targeting and Transgene Expression. PLoS ONE 9(11): e112268. doi.org/-10.1371/journal.pone.-0112268.] Результаты предложены на ФИГ 17A-17D.

Экспрессию векторов AAV8triple, AAVhu68, AAV9, AAV8 и AAVrh79 сравнивали после внутримышечного введения  $10^{13}$  GC/кг AAVrh79 самцам и самкам яванских макаков (ФИГ. 17E).

Векторы, экспрессирующие секретируемый трансген (201Ig IA), вводили внутримышечно в икроножную мышцу самцов мышей RAG KO ( $n=5/\text{группу}$ ) ( $3 \times 10^{10}$  или  $3 \times 10^{11}$  GC/мышь). Результаты показали, что AAV8triple лучше экспрессируется после внутримышечной инъекции, и при более низкой протестированной дозе разница в экспрессии AAV8triple была значительной. Чем выше доза, тем выше экспрессия AAVrh79 на уровнях, сравнимых с другими тестируемыми векторами (ФИГ. 17F).

Самку яванской макаки (RA2362) предварительно проверяли на NAb (ФИГ. 18A) и инъекцировали AAVG2.TBG.eGFP.WPRE.bGH ( $1 \times 10^{13}$  ddGC/кг, внутривенно). Животное подвергали эвтаназии через 7 дней после лечения и проводили вскрытие, чтобы изолировать печень и другие ткани для анализа. Экспрессию GFP в печени и селезенке оценивали на 7 день (ФИГ. 18B и 18C). Уровни вектора, обнаруженного в различных тканях, показаны на ФИГ. 18D. Уровни экспрессии GFP оценивали в печени животных, которым вводили векторы AAVG2 (RA2362) или AAV8 и AAVG3 (ФИГ. 18E - ФИГ. 1J). ФИГ. 18K показывает уровни вектора, обнаруженные в различных тканях этих животных.

Были созданы различные векторы AAV8 и AAVrh79, а в некоторых случаях было получено несколько партий. Сравнивали выход этих партий векторов AAV9 и AAVrh79 (ФИГ. 19).

Векторы AAVrh79 оценивали на дезамидирование, как описано в примере 1 для AAV8 и AAV9. Результаты показывают, что векторы содержат четыре аминокислоты с высокой степенью дезамидирования (N57, N263, N385, N514), которые соответствуют аспарагинам в парах аспарагин-глицин на основе нумерации AAVrh79 (SEQ ID NO: 1). Более низкие проценты дезамидирования постоянно наблюдаются в остатках N94, N254, N410.

| Модификации<br>AAVrh79<br>SEQ ID NO: 2 | WL178<br>1S | WL178<br>4S | WL178<br>5S | WL1781S         | WL1784S         | WL1785S         |
|----------------------------------------|-------------|-------------|-------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Фермент                                | Трипси<br>н | Трипси<br>н | Трипси<br>н | Химотрип<br>син | Химотрип<br>син | Химотрип<br>син |
| % покрытия                             | 89,6        | 93,9        | 92,4        | 91,3            | 88,7            | 89,9            |
| N57+Дезамидирова<br>ние                | 99,3        | 80,9        | 82,9        | 99,6            | 80,1            | 86,4            |
| N94+Дезамидирова<br>ние                | 10,4        | 9,6         | 9,9         | 10,5            | 9,4             | 10,0            |
| ~N254+Дезамидиро<br>вание              | 16,0        | 15,8        | 16,4        | 15,3            | 16,3            | 16,7            |
| ~N263+Дезамидиро<br>вание              | 84,3        | 93,5        | 95,3        | 82,9            | 89,5            | 90,6            |

|                            |       |       |       |      |      |      |
|----------------------------|-------|-------|-------|------|------|------|
| ~N305+Дезамидирование      | 3,2   | 2,5   | 2,4   | 3,2  | 2,6  | 2,3  |
| ~N385+Дезамидирование      | 79,1  | 100,0 | 100,0 | 76,9 | 96,6 | 92,9 |
| ~N410+Дезамидирование      | 2,0   | 17,8  | 23,9  | 2,0  | 17,6 | 23,0 |
| N479+Дезамидирование       | 2,0   | 2,0   | 1,9   | 2,0  | 2,0  | 2,0  |
| ~N514+Дезамидирование      | 100,0 | 97,2  | 97,0  | 97,4 | 94,6 | 98,1 |
| ~Q601+Дезамидирование      | 0,1   |       |       |      |      |      |
| N653+Дезамидирование       | 1,3   | 1,1   | 1,4   | 1,3  | 1,1  | 1,5  |
|                            |       |       |       |      |      |      |
| ~R487+Метилирование        | 0,1   | 0,2   | 0,1   | 0,1  | 0,2  | 0,1  |
|                            |       |       |       |      |      |      |
| D97+Изомеризация           | 1,3   |       |       | 1,2  |      |      |
|                            |       |       |       |      |      |      |
| S149+Фосфорилирование      | 51,9  | 49,0  | 53,2  | 49,6 | 46,6 | 55,8 |
| ~<br>S153+Фосфорилирование | 59,7  | 54,3  | 51,0  | 59,8 | 51,7 | 48,5 |
| ~<br>S474+Фосфорилирование |       | 7,3   | 4,5   |      | 7,0  | 4,3  |
| ~<br>T570+Фосфорилирование | 46,3  | 36,4  | 21,6  | 45,9 | 35,9 | 21,4 |
| ~<br>S665+Фосфорилирование | 0,5   | 0,3   | 0,4   | 0,4  | 0,3  | 0,4  |
|                            |       |       |       |      |      |      |

|                                 |      |      |      |      |      |      |
|---------------------------------|------|------|------|------|------|------|
| W248+Окисление                  |      |      | 0,9  |      |      |      |
| W307+Окисление                  | 1,7  | 1,2  | 1,5  | 1,8  | 1,3  | 1,5  |
| W307+Окисление<br>до кинуренина | 0,3  |      | 0,4  |      |      |      |
| M405+Окисление                  | 5,8  |      |      | 6,0  |      |      |
| M437+Окисление                  | 15,0 | 5,2  | 95,4 | 15,1 | 5,3  | 12,0 |
| M473+Окисление                  | 16,7 | 7,4  | 7,9  | 16,0 | 7,6  | 7,6  |
| W480+Окисление                  | 4,6  | 0,4  | 4,6  | 4,7  | 0,4  | 4,6  |
| W480+Окисление<br>до кинуренина |      |      | 0,1  |      |      |      |
| W505+Окисление                  | 2,4  | 2,2  | 1,3  | 2,5  | 2,1  | 1,3  |
| M526+Окисление                  | 19,0 |      |      | 18,6 |      |      |
| M544+Окисление                  | 30,9 | 20,7 |      | 31,4 | 20,3 |      |
| M561+Окисление                  | 15,6 | 7,7  |      | 16,0 | 7,5  |      |
| W621+Окисление<br>до кинуренина |      |      | 0,0  |      |      |      |
| M637+Окисление                  | 6,9  | 12,5 | 4,5  | 6,9  | 12,6 | 4,7  |
| W697+Окисление                  |      | 0,5  | 0,6  |      | 0,5  | 0,6  |

#### ПРИМЕР 4 Получение AAV8.2.08

Как обсуждается в WO 2017/180854 (включенном в настоящий документ в качестве ссылки), было создано несколько мутантов AAV8 c41, c42, c46, g110, g113, g115 и g117 с мутациями в области HVR.VIII. Как обсуждалось в Gurda et al., главный эпитоп ADK8 находится в области HVR.VIII (аминокислоты с 586 по 591 с использованием нумерации AAV8 vp1). Эти мутанты были протестированы *in vitro* на устойчивость к ADK8, а некоторые из них были протестированы *in vivo* на устойчивость к ADK8. См., например, процитированную выше работу Lochrie 2006.

AR2.1-9 были выбраны случайным образом. AR2.25-61 были выбраны на основе частоты. Случайно выбранные варианты, а также варианты с более высокой частотой, живые с точки зрения выхода 6-луночного планшета и трансдукции Huh7. ФИГ. 24 - демонстрирует экспрессию в различных тканях AAV8.AR2.08 (крайний левый набор столбцов).

#### ПРИМЕР 5 Дезамидирование AAV8.AR2.08

Новые последовательности AAV8.AR2.08 предложены в SEQ ID NO: 17 и 18 соответственно, которые были разработаны, как в Примере 4.

А. Получали модификации векторов AAV8.AR2.08 и оценивали на модификации, как описано в Примере 1 для AAV8. Результаты показывают, что векторы содержат пять аминокислот с высокой степенью дезамидирования (N57, N263, N385, N514 и N540),

которые соответствуют аспарагинам в парах аспарагин-глицин на основе нумерации AAV8.AR2.08 (SEQ ID NO: 18). Более низкие проценты дезамидирования постоянно наблюдаются в остатках N94, N254, N410. В отличие от AAV8, дезамидирование не наблюдается в позиции N459 (в среднем 7% в AAV8) или N499 (в среднем 17% в AAV8).

|                                          |          |             |
|------------------------------------------|----------|-------------|
| Модификация AAV8.AR2.08<br>SEQ ID NO: 18 | WL1846CS | WL1846CS    |
| Фермент                                  | Трипсин  | Химотрипсин |
| % покрытия                               | 97,4     | 92,3        |
| N57+Дезамидирование                      | 90,7     | 89,5        |
| N94+Дезамидирование                      | 9,0      | 9,3         |
| ~N254+Дезамидирование                    | 11,8     | 11,7        |
| ~N263+Дезамидирование                    | 88,6     | 86,3        |
| ~N305+Дезамидирование                    | 5,8      | 5,5         |
| ~N385+Дезамидирование                    | 86,1     | 83,3        |
| ~N514+Дезамидирование                    | 100,0    | 99,6        |
| ~N521+Дезамидирование                    | 2,0      | 2,1         |
| ~N540+Дезамидирование                    | 78,6     | 80,5        |
| N590+Дезамидирование                     | 0,4      | 0,4         |
| Q601+Дезамидирование                     | 0,5      | 0,6         |
| N653+Дезамидирование                     | 0,8      | 0,8         |
| N665+Дезамидирование                     | 1,2      | 1,2         |
|                                          |          |             |
| D442+Изомеризация                        | 12,0     |             |
| D584+Изомеризация                        | 1,0      |             |
|                                          |          |             |
| ~ S149+Фосфорилирование                  | 95,9     | 15,4        |
| ~ T417+Фосфорилирование                  | 0,0      |             |
| ~ T454+Фосфорилирование                  | 0,1      |             |
| ~ T493+Фосфорилирование                  | 0,1      |             |
| S600+Фосфорилирование                    | 1,1      |             |
| ~ T663+Фосфорилирование                  | 0,0      |             |
|                                          |          |             |
| ~ W22+Окисление                          | 1,0      | 1,0         |
| ~ M204+Окисление                         | 0,1      | 0,1         |
| ~ M212+Окисление                         | 2,9      | 2,9         |

|                  |      |      |
|------------------|------|------|
| W248+Окисление   | 0,7  | 0,7  |
| W307+Окисление   | 0,6  | 0,6  |
| M405+Окисление   | 0,3  | 0,3  |
| M437+Окисление   | 70,3 | 21,0 |
| M473+Окисление   | 1,7  | 1,7  |
| W480+Окисление   | 0,3  | 0,3  |
| W505+Окисление   | 0,6  | 0,6  |
| M526+Окисление   | 1,0  | 1,0  |
| M561+Окисление   | 1,0  | 1,0  |
| M607+Окисление   | 2,4  | 2,5  |
| ~ W609+Окисление | 0,1  | 0,1  |
| W621+Окисление   | 0,8  | 0,8  |
| M637+Окисление   | 2,9  | 3,0  |
| W697+Окисление   | 0,2  | 0,2  |

В. Секвенирование РНК в одной клетке выявляет тканевую локализацию и сигнатуры транскрипции трансдуцированных гепатоцитов, выделенных из приматов, не являющихся человеком, после обработки AAV8.

Секвенирование РНК одной клетки оказалось мощным методом для характеристики клеточного транскриптома с беспрецедентным разрешением отдельных клеток. В нашей текущей работе мы используем секвенирование РНК одной клетки для изучения транскрипционного ландшафта первичных гепатоцитов, выделенных из макак-резус после обработки вектором AAV8, экспрессирующим GFP. Транскриптомный анализ FACS-отсортированных GFP+ и GFP- клеток выявляет тканевую локализацию трансдуцированных клеток в пределах печеночной доли, а также гены и регуляторные пути, участвующие в трансдукции гепатоцитов и регуляции экспрессии транскриптов.

В рамках нашего исследования макак-резус обрабатывали либо  $1 \times 10^{13}$  ddGC/кг AAV8.TBG.EGFP.WPRE (n=1), либо  $1 \times 10^{13}$  ddGC/кг AAV8.2.08.TBG.EGFP.WPRE (вариант AAV8, n=1). Животных умерщвляли через 7 дней после обработки и проводили вскрытие для выделения печени обоих животных. После обработки коллагеназой и градиентного центрифугирования выделенные гепатоциты были отсортированы с помощью FACS по экспрессии трансгена GFP на 96-луночных планшетах BD Precise™. 192 отдельные клетки были выделены от каждого животного (96 GFP+ и 96 GFP-) и впоследствии были использованы для получения библиотек секвенирования одноклеточной РНК в соответствии со стандартным протоколом BD Precise™. Данные были проанализированы с использованием пакетов Seurat, Scran и Scater в R для определения дифференциально экспрессируемых транскриптов между отсортированными по GFP- и GFP+ клетками и для выполнения пространственной реконструкции

выделенных клеток в пределах печеночной доли с использованием установленных сигнатур транскрипционной экспрессии.

Было обнаружено, что AAV8.AR2.08 обладает повышенным тропизмом к печени и демонстрирует 1,5-кратное увеличение эффективности трансдукции по сравнению с AAV8. Анализ транскриптома отдельных клеток отсортированных гепатоцитов показывает, что экспрессирующие трансген клетки равномерно распределены по доле печени, демонстрируя небольшое предпочтение перипортальной области, что также наблюдалось при гистопатологии. Интересно, что субпопуляция отсортированных GFP-клеток, как обнаружено, экспрессирует транскрипт трансгена на уровнях, сравнимых с отсортированными клетками GFP+, что позволяет предположить, что эти клетки действительно трансдуцируются и экспрессируют мРНК трансгена, несмотря на отсутствие детектируемых уровней транслируемого белка. Сравнение профилей транскрипции клеток GFP- и GFP+ выявляет дифференцированно экспрессируемые транскрипты, участвующие в трансляции вирусной мРНК, выясняя возможные пути, участвующие в регуляции экспрессии трансгенного белка в трансдуцированных клетках.

C. Выделение варианта аденоассоциированного вируса 8 с лучшей трансдукцией в печень и более высокой печеночной специфичностью у приматов, не являющихся человеком, с направленной эволюцией на модели ксенотрансплантата печени человека.

Чтобы получить варианты AAV с лучшей трансдукцией и более высокой специфичностью, мы выполнили AAV-направленную эволюцию, используя насыщающий мутагенез, нацеленный на участки, экспонированные на поверхности капсида AAV8, эталон для генной терапии печени, с последующими двумя раундами обогащения *in vivo* мышшиной модели ксенотрансплантата печени человека, и выделенный вариант AAV8 под названием AAV8.2.08. После внутривенной инъекции приматам, не являющимся человеком, в дозе  $1 \times 10^{13}$  копий генома (GC)/кг массы тела копии генома вектора, доставленные с помощью AAV8.AR2.08 в различные органы (включая легкие, сердце, желудок, поджелудочную железу, почки и мезентериальные лимфатические узлы), уменьшались, в то время как доставка в печень увеличивалась по сравнению с AAV8, что означает лучшую печеночную трансдукцию и более высокую тканевую специфичность. Секвенирование следующего поколения показало значительное обогащение AAV8.AR2.08 во время отбора *in vivo*, демонстрируя потенциал подхода к выделению капсидов с новыми и улучшенными тропизмами. Другие сравнения показаны на ФИГ. 21-27). ФИГ. 28 показывает биораспределение AAV8.AR2.08 и AAV8.

#### D. Баркодирование

6 черным мышам вводили внутривенно с  $2 \times 10^{12}$  GC/мышь смеси gAAVG3, полученной из 12 препаратов (ФИГ. 18B). Каждый препарат содержит отдельный баркод в векторном геноме, позволяющий идентифицировать конкретный препарат (ФИГ. 18A). Через две недели животных умерщвляли и собирали ткани. Как и предполагалось, экспрессия gAAVG3 была выше в печени, чем в сердце или мышцах. ФИГ. 18C. Эксперименты по распределению в тканях показывают, что фактические частоты

совпадают с теоретическими частотами баркодов во введенной векторной смеси (ФИГ. 18D, всего; ФИГ. 19А, 19В, мышцы; ФИГ. 19С, 19D, сердце; и ФИГ. 19Е, 19F, печень) с небольшими аномалиями в ВС02 и ВС06 (ФИГ. 20А-20С). Все документы, цитируемые в этом описании, включены в него посредством ссылки. Предварительные заявки на патент США № 62/722 388 и 62/722 382, поданные 24 августа 2018 г., предварительные заявки на патент США № 62/703 670 и 62/703 673, поданные 26 июля 2018 г., предварительные заявки на патент США № 62/677 471 и 62/677 474, поданные 29 мая 2018 г., предварительная заявка на патент США № 62/667 585, поданная 29 мая 2018 г., и предварительная заявка на патент США № 62/635 964, поданная 27 февраля 2018 г., включены в настоящий документ посредством ссылки. Предварительная заявка на патент США № 62/667 881, поданная 7 мая 2018 г., предварительная заявка на патент США № 62/667 888, поданная 7 мая 2018 г., предварительная заявка на патент США № 62/667 587, поданная 6 мая 2018 г., предварительная заявка на патент США № 62/663 797, поданная 27 апреля 2018 г., предварительная заявка на патент США № 62/663 788, поданная 27 апреля 2018 г., предварительная заявка на патент США № 62/635 968, поданная 27 февраля 2018 г., включены посредством ссылки. SEQ ID NO, на которые имеются ссылки в данном документе и которые представлены в прилагаемом перечне последовательностей, включены посредством ссылки. Несмотря на то, что изобретение было описано со ссылкой на конкретные варианты воплощения, следует понимать, что модификации могут быть выполнены без отклонения от сущности изобретения. Предполагается, что такие модификации входят в объем прилагаемой формулы изобретения.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV), содержащий:

(а) капсид AAVrh79, содержащий один или более из следующих компонентов:

(1) капсидные белки AAVrh79, содержащие:

гетерогенную популяцию белков vp1 AAVrh79, выбранную из: белков vp1, полученных путем экспрессии из последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность от 1 до 738 из SEQ ID NO:2, белков vp1, полученных из SEQ ID NO:1, или белков vp1, полученных из последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 70% идентичной SEQ ID NO:1, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность от 1 до 738 SEQ ID NO:2,

гетерогенную популяцию белков vp2 AAVrh79, выбранную из: белков vp2, полученных путем экспрессии из последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно из аминокислот 138-738 из SEQ ID NO:2, белков vp2, полученных из последовательности, содержащей по меньшей мере нуклеотиды от 412 до 2214 SEQ ID NO:1, или белков vp2, полученных из последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 70% идентичной по меньшей мере нуклеотидам от 412 до 2214 SEQ ID NO:1, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно из аминокислот от 138 до 738 из SEQ ID NO:2,

гетерогенную популяцию белков vp3 AAVrh79, выбранную из: белков vp3, полученных путем экспрессии из последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно из аминокислот от 204 до 738 из SEQ ID NO:2, белков vp3, полученных из последовательности, содержащей по меньшей мере нуклеотиды от 607 до 2214 SEQ ID NO:1, или белков vp3, полученных из последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 70% идентичной по меньшей мере нуклеотидам от 607 до 2214 SEQ ID NO:1, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно из аминокислот от 204 до 738 из SEQ ID NO:2; и/или

(2) гетерогенную популяцию белков vp1, которые являются продуктом последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, гетерогенную популяцию белков vp2, которые являются продуктом последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно из аминокислот 138-738 из SEQ ID NO: 2, и гетерогенную популяцию белков vp3, которые являются продуктом последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей по меньшей мере аминокислоты от 204 до 738 из SEQ ID NO:2, в которых белки vp1, vp2 и vp3 содержат субпопуляции с аминокислотными модификациями, включающими по меньшей мере два сильно дезамидированных аспарагина (N) в парах аспарагин-глицин в SEQ ID NO: 2 и, необязательно, дополнительно включая субпопуляции, содержащие другие

дезамидированные аминокислоты, причем дезамидирование приводит к замене аминокислоты; и

(б) векторный геном в капсиде AAVrh79, причем векторный геном содержит молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую последовательности инвертированных концевых повторов AAV, и последовательность нуклеиновой кислоты, не относящуюся к AAV, кодирующую продукт, функционально связанный с последовательностями, которые направляют экспрессию продукта в клетке-хозяине.

2. Рекомбинантный аденоассоциированный вирус по п.1, отличающийся тем, что дезамидированные аспарагины дезамидированы до аспарагиновой кислоты, изоаспарагиновой кислоты, взаимопревращающейся пары аспарагиновой кислоты или изоаспарагиновой кислоты или их комбинаций.

3. Рекомбинантный аденоассоциированный вирус по любому из п.п. 1 или 2, отличающийся тем, что капсид дополнительно содержит дезамидированный(е) глутамин(ы), который(е) дезамидирован(ы) до ( $\alpha$ )-глутаминовой кислоты,  $\gamma$ -глутаминовой кислоты, взаимопревращающейся пары ( $\alpha$ )-глутаминовой кислоты или  $\gamma$ -глутаминовой кислоты или их комбинаций.

4. Рекомбинантный аденоассоциированный вирус по любому из п.п. 1-3, отличающийся тем, что капсид AAVrh79 содержит субпопуляции, имеющие одно или более из:

(а) по меньшей мере 75% аспарагинов (N) в парах аспарагин-глицин, расположенных в позиции 57 белков vp1, дезамидированы, на основе нумерации SEQ ID NO:2;

(б) по меньшей мере 75% N в парах аспарагин-глицин, расположенных в позиции 263 белков vp1, v2 и vp3, дезамидированы, на основе нумерации остатков аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2,

(в) по меньшей мере 70% N в парах аспарагин-глицин, расположенных в позиции 385 белков vp1, v2 и vp3, дезамидированы, на основе нумерации остатков аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2; и/или

(г) по меньшей мере 85% N в парах аспарагин-глицин, расположенных в позиции 514 белков vp1, v2 и vp3, дезамидированы, на основе нумерации остатков аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2.

5. Рекомбинантный аденоассоциированный вирус по любому из п.п. 1-4, отличающийся тем, что капсид rAAVrh79 содержит субпопуляцию vp1, в которой от 75% до 100% N в позиции 57 белков vp1 дезамидированы, как определено с помощью масс-спектрометрии.

6. Рекомбинантный аденоассоциированный вирус по любому из п.п. 1-5, отличающийся тем, что капсид rAAVrh79 содержит субпопуляцию белков vp1, белков vp2 и/или белков vp3, в которой от 75% до 100% N в позиции 263 на основе нумерации SEQ ID NO:2, дезамидированы, как определено с помощью масс-спектрометрии.

7. Рекомбинантный аденоассоциированный вирус по любому из п.п. 1-6,

отличающийся тем, что капсид rAAVrh79 содержит субпопуляцию белков vp1, белков vp2 и/или белков vp3, в которой от 75% до 100% N в позиции 385 на основе нумерации SEQ ID NO:2, дезамидированы, как определено с помощью масс-спектрометрии.

8. Рекомбинантный аденоассоциированный вирус по любому из п.п. 1-7, отличающийся тем, что капсид rAAVrh79 содержит субпопуляцию белков vp1, белков vp2 и/или белков vp3, в которой от 75% до 100% N в позиции 514 на основе нумерации SEQ ID NO:2, дезамидированы.

9. Рекомбинантный аденоассоциированный вирус по любому из п.п. 1-8, отличающийся тем, что последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая белки, представляет собой SEQ ID NO: 1, или последовательность от по меньшей мере на 80% до по меньшей мере на 99% идентичную SEQ ID NO: 1, которая кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2.

10. Рекомбинантный аденоассоциированный вирус по п. 9, отличающийся тем, что последовательность нуклеиновой кислоты по меньшей мере на 80-97% идентична SEQ ID NO: 1.

11. Рекомбинантный аденоассоциированный вирус по любому из п.п. 1-10, отличающийся тем, что капсид rAAVrh79 дополнительно содержит по меньшей мере субпопуляцию белков vp1, vp2 и/или vp3, имеющих модификации аминокислот из SEQ ID NO: 2, содержащие по меньшей мере приблизительно от 50 до 100% дезамидирования по меньшей мере на четырех позициях, выбранных из одного или более из N57, 263, 385, 514 или их комбинаций.

12. Рекомбинантный аденоассоциированный вирус по любому из п.п. 1-11, отличающийся тем, что капсид rAAVrh79 содержит субпопуляции белков vp1, vp2 и/или vp3, которые дополнительно содержат от 1% до приблизительно 40% дезамидирования по меньшей мере в одной или более позиций N94, N254, N305, N410, N479, N653 или их комбинаций.

13. Рекомбинантный аденоассоциированный вирус по любому из п.п. 1-11, отличающийся тем, что капсид rAAVrh79 содержит субпопуляции белков vp1, vp2 и/или vp3, которые дополнительно содержат одну или более модификаций, выбранных из одной или более модификаций в одном или более из следующих: ацетилированный лизин, фосфорилированный серин и/или треонин, изомеризованная аспарагиновая кислота, окисленный триптофан и/или метионин, или амидированная аминокислота.

14. Рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV), который содержит:

(A) капсид AAV8.AR2.08, содержащий одно или более из:

(1) капсидных белков AAV G3, содержащих:

гетерогенную популяцию белков vp1 AAV8.AR2.08, выбранных из: белков vp1, полученных путем экспрессии из последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность от 1 до 738 из SEQ ID NO: 18, белков vp1, полученных из SEQ ID NO:17, или белков vp1, полученных из последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 70% идентичной SEQ ID

NO:17, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность от 1 до 738 SEQ ID NO:18,

гетерогенную популяцию белков vp2 AAV8.AR2.08, выбранных из: белков vp2 AAV8.AR2.08, полученных путем экспрессии из последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно из аминокислот 138-738 из SEQ ID NO:18, белков vp2, полученных из последовательности, содержащей по меньшей мере нуклеотиды от 411 до 2214 SEQ ID NO:17, или белков vp2, полученных из последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 70% идентичной по меньшей мере нуклеотидам от 412 до 2214 SEQ ID NO:17, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно из аминокислот от 138 до 738 из SEQ ID NO:18.

гетерогенную популяцию белков vp3 AAV8.AR2.08, выбранную из: белков vp3, полученных путем экспрессии из последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно из аминокислот от 204 до 738 из SEQ ID NO:18, белков vp3, полученных из последовательности, содержащей по меньшей мере нуклеотиды от 607 до 2214 SEQ ID NO:17, или белков vp3, полученных из последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 70% идентичной по меньшей мере нуклеотидам от 607 до 2214 SEQ ID NO:17, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно из аминокислот от 204 до 738 из SEQ ID NO:18; и/или

(2) гетерогенную популяцию белков vp1, которые являются продуктом последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, гетерогенную популяцию белков vp2, которые являются продуктом последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно из аминокислот 138-738 из SEQ ID NO: 18, гетерогенную популяцию белков vp3, которые являются продуктом последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей по меньшей мере аминокислоты от 204 до 738 из SEQ ID NO:18, в которых белки vp1, vp2 и vp3 содержат субпопуляции с аминокислотными модификациями, включающими по меньшей мере два сильно дезамидированных аспарагина (N) в парах аспарагин-глицин в SEQ ID NO: 18 и, необязательно, дополнительно включающими субпопуляции, содержащие другие дезамидированные аминокислоты, причем дезамидирование приводит к замене аминокислоты; и

(Б) векторный геном в капсиде AAV8.AR2.08, причем векторный геном содержит молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую последовательности инвертированных концевых повторов AAV, и последовательность нуклеиновой кислоты, не относящуюся к AAV, кодирующую продукт, функционально связанный с последовательностями, которые направляют экспрессию продукта в клетке-хозяине.

15. Рекомбинантный аденоассоциированный вирус по п.14, отличающийся тем, что

дезамидированные аспарагины дезамидированы до аспарагиновой кислоты, изоаспарагиновой кислоты, взаимопревращающейся пары аспарагиновой кислота или изоаспарагиновой кислоты или их комбинаций.

16. Рекомбинантный аденоассоциированный вирус по любому из п.п. 14 или 15, отличающийся тем, что капсид дополнительно содержит дезамидированный(е) глутамин(ы), который(е) дезамидирован(ы) до ( $\alpha$ )-глутаминовой кислоты,  $\gamma$ -глутаминовой кислоты, взаимопревращающейся пары ( $\alpha$ )-глутаминовой кислоты или  $\gamma$ -глутаминовой кислоты или их комбинаций.

17. Рекомбинантный аденоассоциированный вирус по любому из п.п. 14-16, отличающийся тем, что капсид AAV8.AR2.08 содержит субпопуляции, имеющие одно или более из:

(а) по меньшей мере 75% аспарагинов (N) в парах аспарагин-глицин, расположенных в позициях 57 белков vp1, дезамидированы, на основе нумерации SEQ ID NO: 18;

(б) по меньшей мере 75% N в парах аспарагин-глицин, расположенных в позиции 263 белков vp1, v2 и vp3, дезамидированы, на основе нумерации остатков аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 18,

(в) по меньшей мере 70% N в парах аспарагин-глицин, расположенных в позиции 385 белков vp1, v2 и vp3, дезамидированы, на основе нумерации остатков аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 18; и/или

(г) по меньшей мере 85% N в парах аспарагин-глицин, расположенных в позиции 514 белков vp1, v2 и vp3, дезамидированы, на основе нумерации остатков аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 18; и/или

(д) по меньшей мере 85% N в парах аспарагин-глицин, расположенных в позиции 540 белков vp1, v2 и vp3, дезамидированы, на основе нумерации остатков аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 18.

18. Рекомбинантный аденоассоциированный вирус по любому из п.п. 14-17, отличающийся тем, что капсид гAAV8.AR2.08 содержит субпопуляцию vp1, в которой от 75% до 100% N в позиции 57 белков vp1 дезамидированы, как определено с помощью масс-спектрометрии.

19. Рекомбинантный аденоассоциированный вирус по любому из п.п. 14-18, отличающийся тем, что капсид гAAV8.AR2.08 содержит субпопуляцию белков vp1, белков vp2 и/или белков vp3, в которой от 75% до 100% N в позиции 263 на основе нумерации SEQ ID NO:2, дезамидированы, как определено с помощью масс-спектрометрии.

20. Рекомбинантный аденоассоциированный вирус по любому из п.п. 14-19, отличающийся тем, что капсид гAAV8.AR2.08 содержит субпопуляцию белков vp1, белков vp2 и/или белков vp3, в которой от 75% до 100% N в позиции 385 на основе нумерации SEQ ID NO:2, дезамидированы, как определено с помощью масс-спектрометрии.

21. Рекombинантный аденоассоциированный вирус по любому из п.п. 14-20, отличающийся тем, что капсид гAAV8.AR2.08 содержит субпопуляцию белков vp1, белков vp2 и/или белков vp3, в которой от 75% до 100% N в позиции 514 на основе нумерации SEQ ID NO:2, дезамидированы.

22. Рекombинантный аденоассоциированный вирус по любому из п.п. 14-20, отличающийся тем, что капсид гAAV8.AR2.08 содержит субпопуляцию белков vp1, белков vp2 и/или белков vp3, в которой от 75% до 100% N в позиции 540 на основе нумерации SEQ ID NO:2, дезамидированы.

23. Рекombинантный аденоассоциированный вирус по любому из п.п. 14-22, отличающийся тем, что последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая белки, представляет собой SEQ ID NO: 17, или последовательность от по меньшей мере на 80% до по меньшей мере на 99% идентичную SEQ ID NO: 17, которая кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18.

24. Рекombинантный аденоассоциированный вирус по п. 23, отличающийся тем, что последовательность нуклеиновой кислоты по меньшей мере на 80-97% идентична SEQ ID NO: 17.

25. Рекombинантный аденоассоциированный вирус по любому из п.п. 1-10, отличающийся тем, что капсид гAAV8.AR2.08 дополнительно содержит по меньшей мере субпопуляцию белков vp1, vp2 и/или vp3, имеющих модификации аминокислот из SEQ ID NO: 18, содержащие по меньшей мере приблизительно от 50 до 100% дезамидирования по меньшей мере на четырех позициях, выбранных из одного или более из N57, 263, 385, 514, 540 или их комбинаций.

26. Рекombинантный аденоассоциированный вирус по любому из п.п. 14-25, отличающийся тем, что капсид гAAV8.AR2.08 содержит субпопуляции белков vp1, vp2 и/или vp3, которые дополнительно содержат от 1% до приблизительно 40% дезамидирования по меньшей мере в одной или более позиций N94, N254, N305, N521 или их комбинации.

27. Рекombинантный аденоассоциированный вирус по любому из п.п. 14-25, отличающийся тем, что капсид гAAV8.AR2.08 содержит субпопуляции белков vp1, vp2 и/или vp3, которые дополнительно содержат одну или более модификаций, выбранных из одной или более модификаций в одном или более из следующих: ацетилированный лизин, фосфорилированный серин и/или треонин, изомеризованная аспарагиновая кислота, окисленный триптофан и/или метионин, или амидированная аминокислота.

28. Рекombинантный аденоассоциированный вирус (гAAV), который содержит:

(А) капсид AAV5.5.9, содержащий одно или более из:

(1) капсидные белки AAV5.5.9, содержащие:

гетерогенную популяцию белков vp1 AAV5.5.9, выбранных из: белков vp1, полученных путем экспрессии из последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность от 1 до 736 из SEQ ID NO: 10, белков vp1, полученных из SEQ ID NO:9, или белков vp1, полученных из

последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 70% идентичной SEQ ID NO:9, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность от 1 до 726 SEQ ID NO:1,

гетерогенную популяцию белков *vr2* AAV5.5.9, выбранных из: белков *vr2* AAV5.5.9, полученных путем экспрессии из последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно из аминокислот 137-726 из SEQ ID NO:10, белков *vr2*, полученных из последовательности, содержащей по меньшей мере нуклеотиды от 409 до 2178 SEQ ID NO:9, или белков *vr2*, полученных из последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 70% идентичной по меньшей мере нуклеотидам от 409 до 2178 SEQ ID NO:9, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно из аминокислот от 137 до 726 из SEQ ID NO:10.

гетерогенную популяцию белков *vr3* AAV5.5.9, выбранных из: белков *vr3* AAV5.5.9, полученных путем экспрессии из последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно из аминокислот 193-726 из SEQ ID NO:10, белков *vr3*, полученных из последовательности, содержащей по меньшей мере нуклеотиды от 577 до 2178 SEQ ID NO:9, или белков *vr3*, полученных из последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 70% идентичной по меньшей мере нуклеотидам от 577 до 2178 SEQ ID NO:9, которая кодирует предсказанную аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно из аминокислот от 193 до 726 из SEQ ID NO:10; и/или

(2) гетерогенную популяцию белков *vr1*, которые являются продуктом последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, гетерогенную популяцию белков *vr2*, которые являются продуктом последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотную последовательность по меньшей мере приблизительно из аминокислот 137-726 из SEQ ID NO: 10, гетерогенную популяцию белков *vr3*, которые являются продуктом последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей по меньшей мере аминокислоты от 193 до 726 из SEQ ID NO:10, в которых белки *vr1*, *vr2* и *vr3* содержат субпопуляции с аминокислотными модификациями, включающими по меньшей мере два сильно дезамидированных аспарагина (N) в парах аспарагин-глицин в SEQ ID NO: 10 и, необязательно, дополнительно включая субпопуляции, содержащие другие дезамидированные аминокислоты, где дезамидирование приводит к замене аминокислоты; и

(Б) векторный геном в капсиде AAV5.5.9, причем векторный геном содержит молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую последовательности инвертированных концевых повторов AAV, и последовательность нуклеиновой кислоты, не относящуюся к AAV, кодирующую продукт, функционально связанный с последовательностями, которые направляют экспрессию продукта в клетке-хозяине.

29. Рекомбинантный аденоассоциированный вирус по п.28, отличающийся тем, что

дезамидированные аспарагины дезамидированы до аспарагиновой кислоты, изоаспарагиновой кислоты, взаимопревращающейся пары аспарагиновая кислота/изоаспарагиновая кислота или их комбинаций.

30. Рекомбинантный аденоассоциированный вирус по любому из п.п. 28 или 29, отличающийся тем, что капсид дополнительно содержит дезамидированный(е) глутамин(ы), который(е) дезамидирован(ы) до ( $\alpha$ )-глутаминовой кислоты,  $\gamma$ -глутаминовой кислоты, взаимопревращающейся пары ( $\alpha$ )-глутаминовая кислота/  $\gamma$ -глутаминовая кислота или их комбинаций.

31. Рекомбинантный аденоассоциированный вирус по любому из п.п. 28-30, отличающийся тем, что капсид AAV5.5.9 содержит субпопуляции, имеющие одно или более из:

(а) по меньшей мере 75% аспарагинов (N) в парах аспарагин-глицин, расположенных в позиции 57 белков vp1, дезамидированы, на основе нумерации SEQ ID NO: 10;

(б) по меньшей мере 70% N в парах аспарагин-глицин, расположенных в позиции 319 белков vp1, v2 и vp3, дезамидированы, на основе нумерации остатков аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10; и/или

(в) по меньшей мере 85% N в парах аспарагин-глицин, расположенных в позиции 442 белков vp1, v2 и vp3, дезамидированы, на основе нумерации остатков аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10; и/или

(г) по меньшей мере 85% N в парах аспарагин-глицин, расположенных в позиции 502 белков vp1, v2 и vp3, дезамидированы, на основе нумерации остатков аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10.

32. Рекомбинантный аденоассоциированный вирус по любому из п.п. 28-31, отличающийся тем, что капсид гAAV5.5.9 содержит субпопуляцию vp1, в которой от 75% до 100% N в позиции 57 белков vp1 дезамидированы, как определено с помощью масс-спектрометрии.

33. Рекомбинантный аденоассоциированный вирус по любому из п.п. 28-32, отличающийся тем, что капсид гAAV5.5.9 содержит субпопуляцию белков vp1, белков vp2 и/или белков vp3, в которой от 75% до 100% N в позиции 319 на основе нумерации SEQ ID NO: 10, дезамидированы, как определено с помощью масс-спектрометрии.

34. Рекомбинантный аденоассоциированный вирус по любому из п.п. 28-33, отличающийся тем, что капсид гAAV5.5.9 содержит субпопуляцию белков vp1, белков vp2 и/или белков vp3, в которой от 75% до 100% N в позиции 442 на основе нумерации SEQ ID NO: 10, дезамидированы, как определено с помощью масс-спектрометрии.

35. Рекомбинантный аденоассоциированный вирус по любому из п.п. 28-34, отличающийся тем, что капсид гAAV5.5.9 содержит субпопуляцию белков vp1, белков vp2 и/или белков vp3, в которой от 75% до 100% N в позиции 502 на основе нумерации SEQ ID NO: 10, дезамидированы.

36. Рекомбинантный аденоассоциированный вирус по любому из п.п. 28-35,

отличающийся тем, что последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая белки, представляет собой SEQ ID NO: 9, или последовательность от по меньшей мере на 80% до по меньшей мере на 99% идентичную SEQ ID NO: 9, которая кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10.

37. Рекомбинантный аденоассоциированный вирус по п. 36, отличающийся тем, что последовательность нуклеиновой кислоты по меньшей мере на 80-97% идентична SEQ ID NO: 9.

38. Рекомбинантный аденоассоциированный вирус по любому из п.п. 28-36, отличающийся тем, что капсид гAAV5.5.9 содержит субпопуляции белков vp1, vp2 и/или vp3, которые дополнительно содержат от 1% до приблизительно 40% дезамидирования по меньшей мере в одной или более позиций N35, N113, N204, N217, N243, N249, N293/294, N304, N399/400, N467, N505, Q589, N618, N641, N653, N658, N699 или их комбинации.

39. Рекомбинантный аденоассоциированный вирус по любому из п.п. 28-38, отличающийся тем, что капсид гAAV5.5.9 содержит субпопуляции белков vp1, vp2 и/или vp3, которые дополнительно содержат одну или более модификаций, выбранных из одной или более модификаций в одном или более из следующих: ацетилованный лизин, фосфорилированный серин и/или треонин, изомеризованная аспарагиновая кислота, окисленный триптофан и/или метионин, или амидированная аминокислота.

40. Рекомбинантный аденоассоциированный вирус по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что содержит приблизительно 60 общих капсидных белков в соотношении от приблизительно 1 белка vp1 до приблизительно от 1 до 1,5 белков vp2 до 3-10 белков vp3.

41. Рекомбинантный аденоассоциированный вирус по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что последовательности ITR аденоассоциированного вируса представляют собой ITR 5' и 3' ITR от источника аденоассоциированного вируса, отличного от аденоассоциированного вируса, обеспечивающего капсид.

42. Композиция, содержащая аденоассоциированный вирус по любому из предыдущих пунктов и фармацевтический носитель, наполнитель и/или разбавитель.

43. Рекомбинантный аденоассоциированный вирус по любому из п.п. 1-41 или композиция по п. 42, отличающиеся тем, что предназначены для доставки желаемого генного продукта нуждающемуся в этом субъекту.

44. Применение аденоассоциированного вируса по любому из п.п. 1-41 или композиции по п. 42 для доставки желаемого генного продукта нуждающемуся в этом субъекту.

45. Способ получения рекомбинантного аденоассоциированного вируса, содержащего капсид AAV, включающий стадии культивирования клетки-хозяина, содержащей: (а) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую капсидный белок аденоассоциированного вируса, выбранный из: капсидного белка vp1, аминокислот с 1 по 738, SEQ ID NO: 2 (капсидный белок AAVrh79); капсидного белка vp2, аминокислот 138-738, SEQ ID NO: 2 (капсидный белок AAVrh79); или капсидного белка

vp3, аминокислот 204-738, SEQ ID NO: 2 (капсидный белок AAVrh79); (б) функциональный ген повтора; (в) миниген, содержащий инвертированные концевые повторы AAV и трансген; и (г) достаточные вспомогательные функции, позволяющие упаковывать миниген в капсид AAV.

46. Способ получения рекомбинантного аденоассоциированного вируса, содержащего капсид AAV, включающий стадии культивирования клетки-хозяина, содержащей: (а) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую капсидный белок AAV, выбранный из: капсидного белка vp1, аминокислот с 1 по 738, SEQ ID NO: 18 (капсидный белок AAV8.AR2.08); капсидного белка vp2, аминокислот 138-738, SEQ ID NO: 18 (капсидный белок AAV8.AR2.08); капсидного белка vp3, аминокислот 204-738, SEQ ID NO: 18 (капсидный белок AAV8.AR2.08); (б) функциональный ген повтора; (в) миниген, содержащий инвертированные концевые повторы AAV (ITR) и трансген; и (г) достаточные вспомогательные функции, позволяющие упаковывать миниген в капсид AAV.

47. Способ получения рекомбинантного аденоассоциированного вируса, содержащего капсид AAV, включающий стадии культивирования клетки-хозяина, содержащей: (а) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую капсидный белок AAV, выбранный из: капсидного белка vp1, аминокислот с 1 по 736, SEQ ID NO: 10 (капсидный белок AAV5.5.9); капсидного белка vp2, аминокислот 138-736, SEQ ID NO: 10 (капсидный белок AAV5.5.9); капсидного белка vp3, аминокислот 203-736, SEQ ID NO: 10 (капсидный белок AAV5.5.9); (б) функциональный ген

повтор; (в) миниген, содержащий инвертированные концевые повторы AAV и трансген; и (г) достаточные вспомогательные функции, позволяющие упаковывать миниген в капсид AAV.

48. Клетка-хозяин, трансфицированная *in vitro* с аденоассоциированным вирусом по любому из предшествующих пунктов.

49. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты:

(а) кодирующая предсказанную аминокислотную последовательность, содержащую аминокислоты с 1 по 738 SEQ ID NO: 2; или

(б) содержащая нуклеотиды с 1 по 2214 SEQ ID NO: 1, или нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 99% идентичную нуклеотидам с 1 по 2214 SEQ ID NO: 1,

при этом, рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты не содержит инвертированного концевого повтора AAV.

50. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты:

(а) кодирующая предсказанную аминокислотную последовательность, содержащую аминокислоты с 1 по 738 SEQ ID NO: 18; или

(б) содержащая нуклеотиды с 1 по 2214 SEQ ID NO: 17, или нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 99% идентичную нуклеотидам с 1 по 2214 SEQ ID NO: 17,

при этом, рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты не содержит инвертированного концевой повтора AAV.

51. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты:

(а) кодирующая предсказанную аминокислотную последовательность, содержащую аминокислоты с 1 по 736 SEQ ID NO: 10; или

(б) содержащая нуклеотиды с 1 по 2214 SEQ ID NO: 1, или нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 99% идентичную нуклеотидам с 1 по 2214 SEQ ID NO: 1,

при этом, рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты не содержит инвертированного концевой повтора аденоассоциированного вируса.

52. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из п.п. 49-51, отличающаяся тем, что дополнительно содержит функциональный ген повтора.

53. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из п.п. 49-51, отличающаяся тем, что указанная молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты представляет собой плазмиду.

54. Клетка-хозяин, трансфицированная рекомбинантной молекулой нуклеиновой кислоты по любому из п.п. 49-53.

55. Клетка-хозяин по п. 54, отличающаяся тем, что содержит функциональный ген повтора, миниген, содержащий инвертированные концевые повторы AAV и трансген, и достаточные вспомогательные функции, позволяющие упаковывать миниген в капсид AAV.

56. Система продуцирования рекомбинантного аденоассоциированного вируса, используемая для получения рекомбинантного AAV по любому из п.п. 1-41, отличающаяся тем, что система продуцирования содержит:

(а) последовательность нуклеиновой кислоты капсида AAV, кодирующую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2, SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 18;

(б) молекулу нуклеиновой кислоты, подходящую для упаковки в капсид AAV, при этом указанная молекула нуклеиновой кислоты содержит по меньшей мере один инвертированный концевой повтор AAV и последовательность нуклеиновой кислоты, не являющейся AAV, кодирующую продукт гена, функционально связанный с последовательностями, которые направляют экспрессию продукта в клетке-хозяине; и

(в) достаточное количество репродуктивных функций и вспомогательных функций AAV для обеспечения упаковки молекулы нуклеиновой кислоты в рекомбинантный капсид AAV.

57. Система по п. 56, отличающаяся тем, что последовательность нуклеиновой кислоты по пункту (а) содержит по меньшей мере SEQ ID NO: 1, или последовательность от по меньшей мере на 70% до по меньшей мере на 99% идентичную SEQ ID NO: 1, которая кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2.

58. Система по п. 56, отличающаяся тем, что последовательность нуклеиновой кислоты по пункту (а) содержит по меньшей мере SEQ ID NO: 9, или последовательность

от по меньшей мере на 70% до по меньшей мере на 99% идентичную SEQ ID NO: 9, которая кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10.

59. Система по п. 56, отличающаяся тем, что последовательность нуклеиновой кислоты по пункту (а) содержит по меньшей мере SEQ ID NO: 17, или последовательность от по меньшей мере на 70% до по меньшей мере на 99% идентичную SEQ ID NO: 17, которая кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18.

60. Система по любому из п.п. 56-59, отличающаяся тем, что культура клеток содержит эмбриональные клетки почки человека 293.

61. Система по любому из п.п. 56-60, отличающаяся тем, что повтор AAVполучен из другого AAV, чем тот, который поставляется капсид.

62. Система по п. 61, отличающаяся тем, что повтор AAVпроисходит от аденоассоциированного вируса AAV2.

63. Композиция, содержащая популяцию рекомбинантного аденоассоциированного вируса, имеющую повышенный титр, активность или трансдукцию, при этом указанная композиция содержит гAAV, имеющий капсиды, которые модифицированы для снижения общего дезамидирования по сравнению с гAAV с паттерном дезамидирования с паттерном дезамидирования капсида в соответствии с любой из Таблицы А (AAVrh79), Таблицы В (AAV8.AR2.08) или Таблицы С (AAV5.5.9), при условии, что гAAV не является AAVhu68.

64. Композиция по п. 63, отличающаяся тем, что капсиды гAAV модифицированы в месте, отличном от:

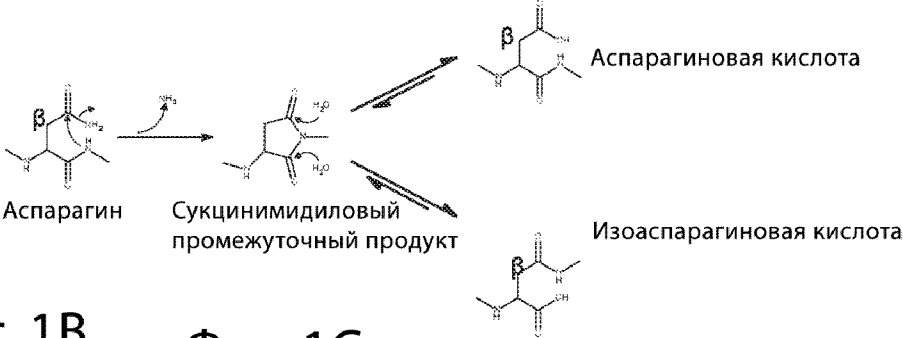
(а) N57, N263, N398 и/или N514, в зависимости от нумерации SEQ ID NO: 2, на основе нумерации предсказанной аминокислотной последовательности vp1 с начальной буквой М, для капсида AAVrh79;

(б) N57, N263, N385, N514 и/или N540 со ссылкой на нумерацию SEQ ID NO: 18, на основе нумерации предсказанной аминокислотной последовательности vp1 с начальной буквой М, для капсида AAV 8.AR2.08;

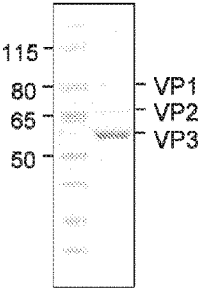
(в) N57, N319, N442 и/или N502 со ссылкой на нумерацию SEQ ID NO: 10, на основе нумерации предсказанной аминокислотной последовательности vp1 с начальной буквой М, для капсида AAV 5.5.

По доверенности

Фиг. 1А



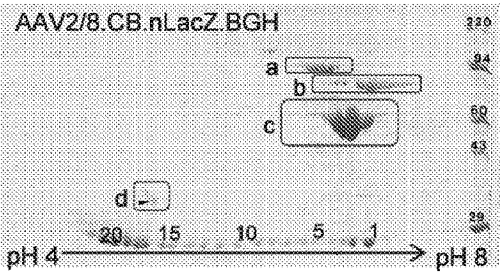
Фиг. 1В



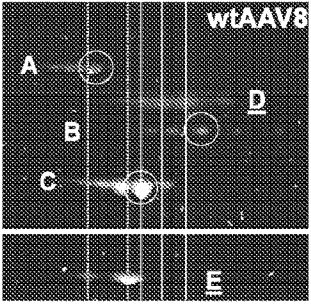
Фиг. 1С

| Пятно | pI   | Пятно | pI   |
|-------|------|-------|------|
| 1     | 7.30 | 11    | 5.70 |
| 2     | 7.11 | 12    | 5.63 |
| 3     | 6.97 | 13    | 5.54 |
| 4     | 6.75 | 14    | 5.46 |
| 5     | 6.61 | 15    | 5.37 |
| 6     | 6.45 | 16    | 5.27 |
| 7     | 6.27 | 17    | 5.20 |
| 8     | 6.11 | 18    | 5.14 |
| 9     | 6.01 | 19    | 5.08 |
| 10    | 5.86 | 20    | 4.99 |

Фиг. 1D

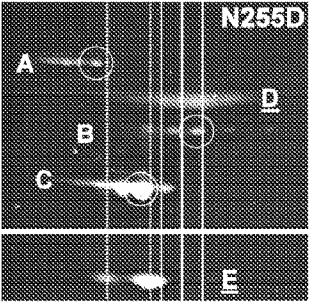


Фиг. 1Е



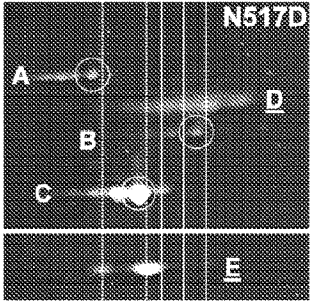
A-AAV8 VP1: 87 кДа  
D-Кональбумин

Фиг. 1F



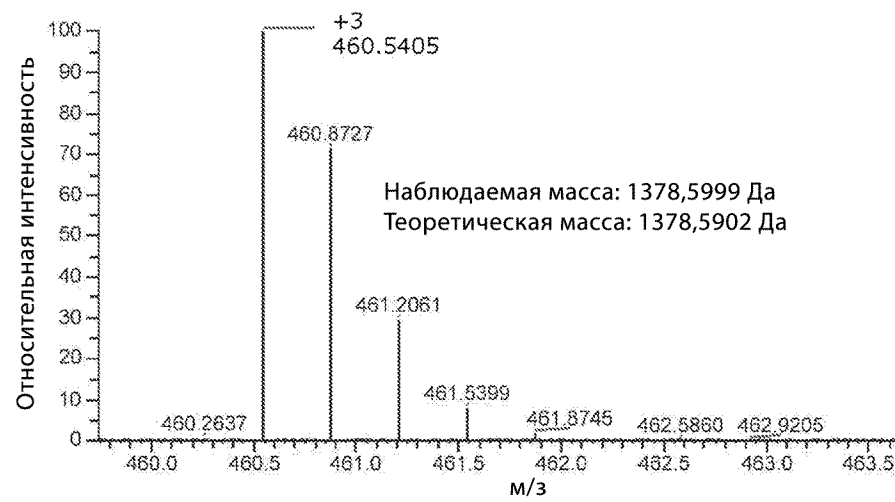
B-AAV8 VP2: 73 кДа  
E-Турбонуклеаза: 27 кДа

Фиг. 1G

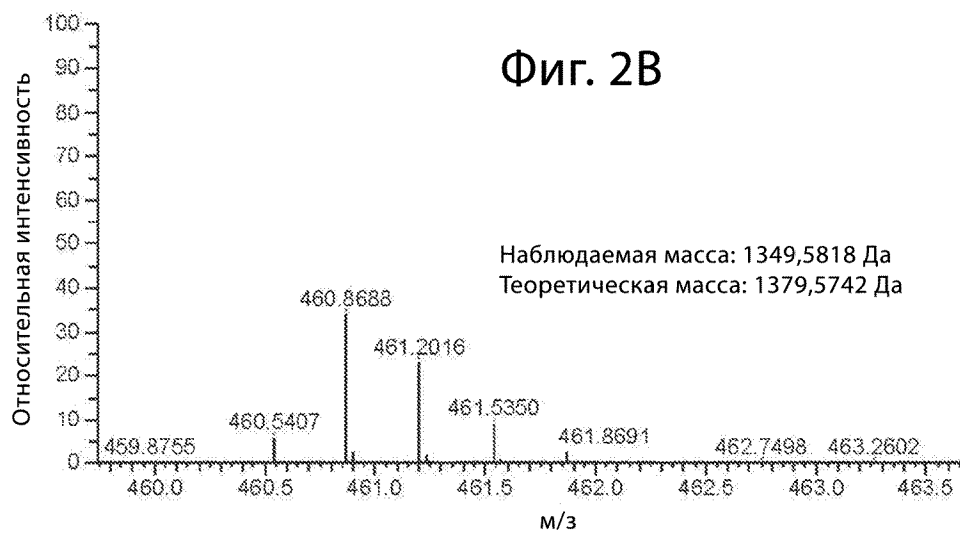


C-AAV8 VP3: 61 кДа

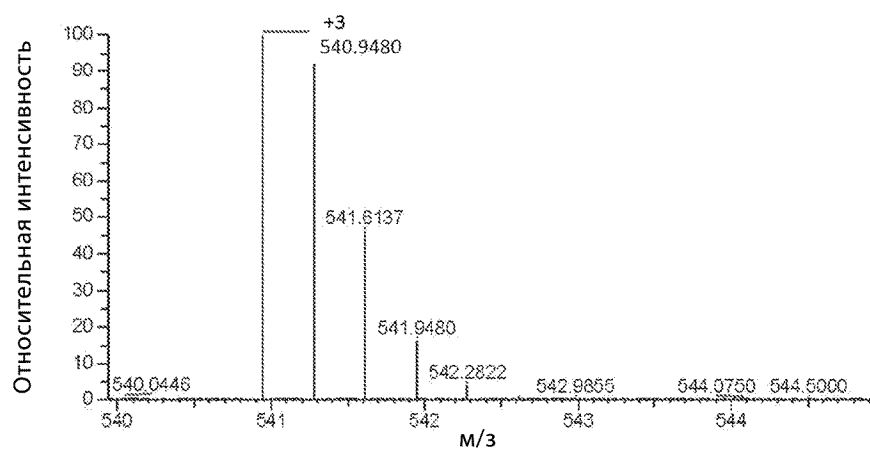
Фиг. 2А



Фиг. 2В

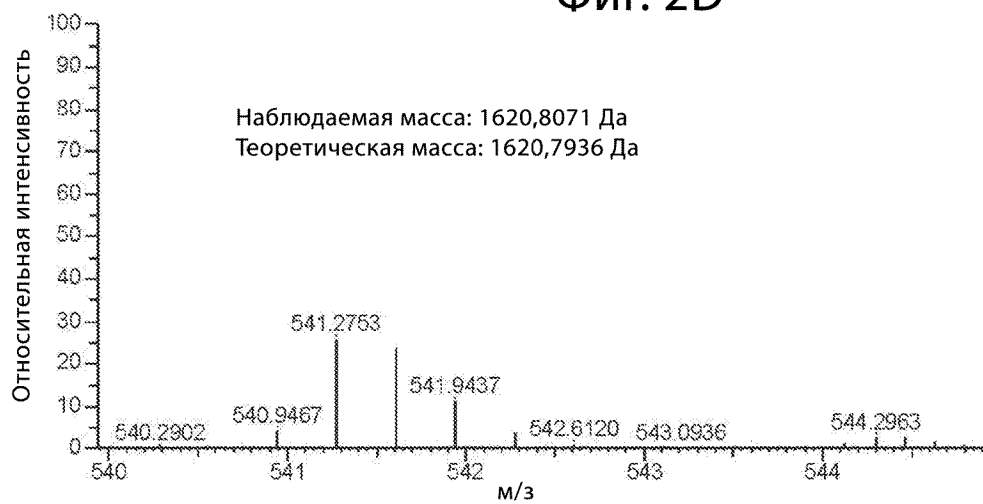


Фиг 2С



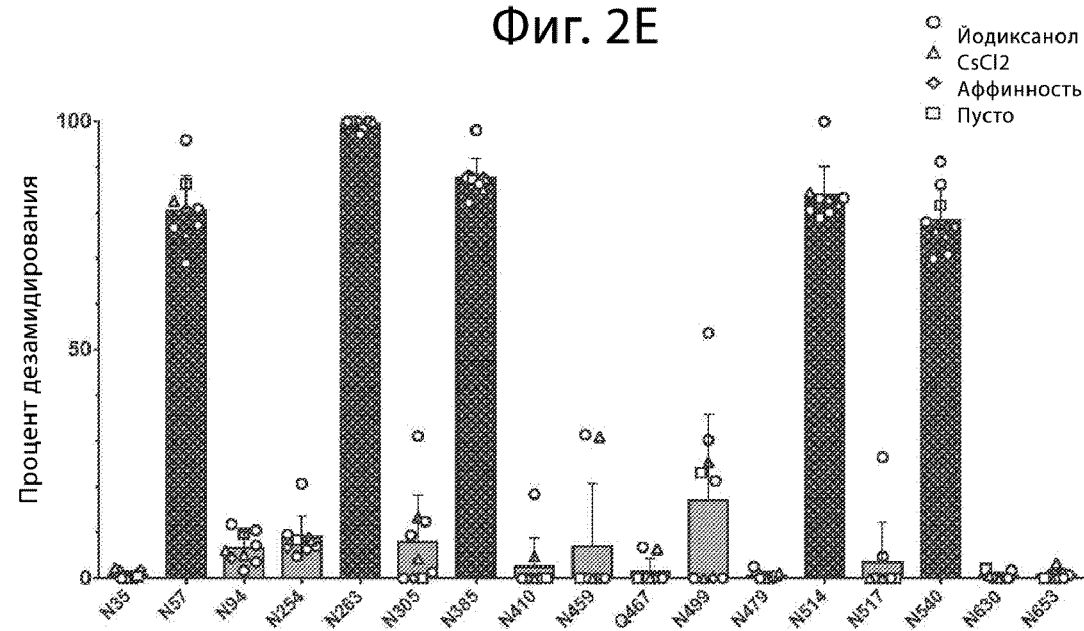
Наблюдаемая масса: 1619,8213 Да  
Теоретическая масса: 1619,8096 Да

Фиг. 2D

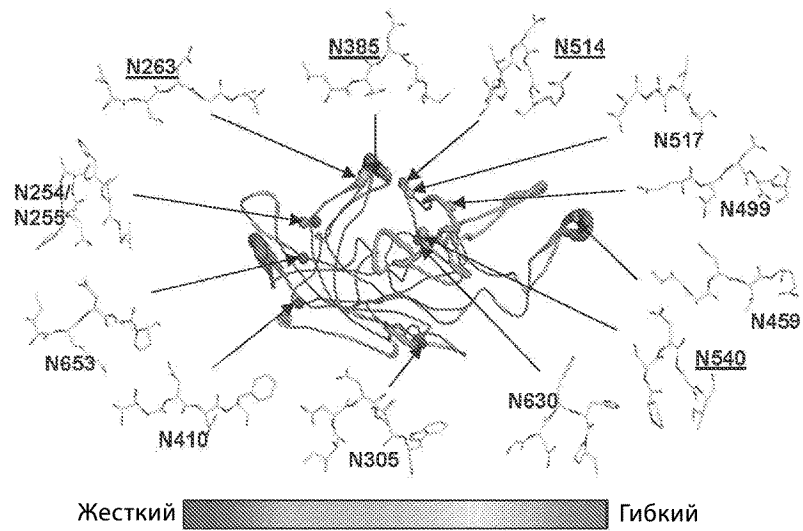


Наблюдаемая масса: 1620,8071 Да  
Теоретическая масса: 1620,7936 Да

Фиг. 2Е

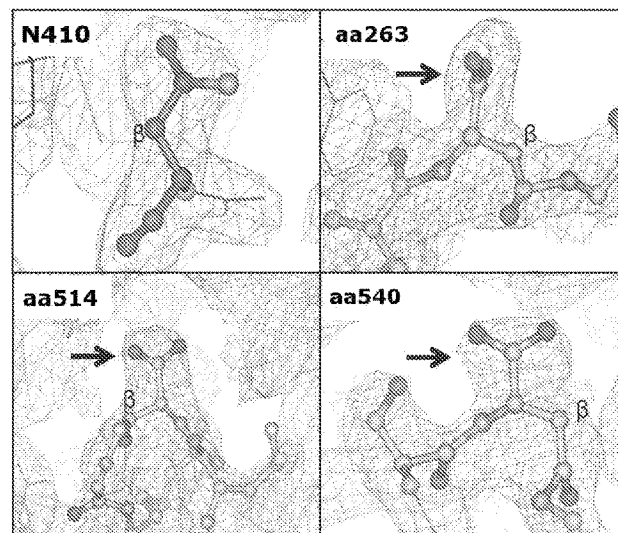


Фиг. 3А



Фиг. 3В

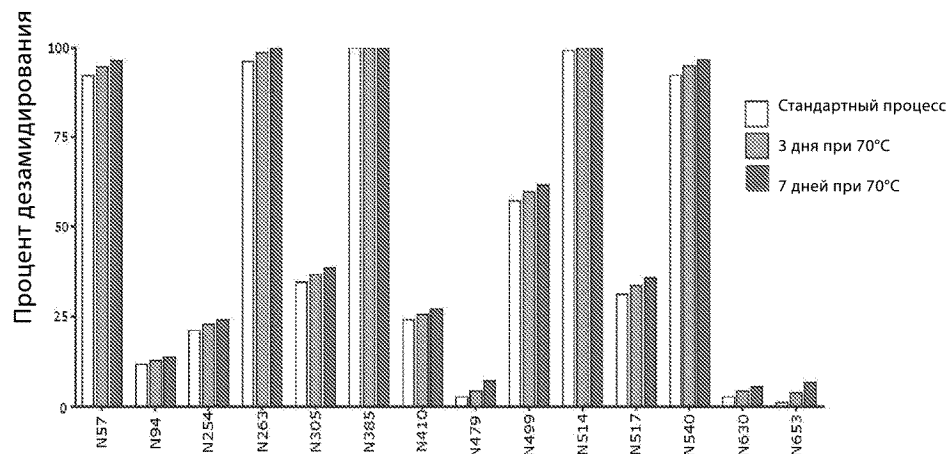
Фиг. 3С



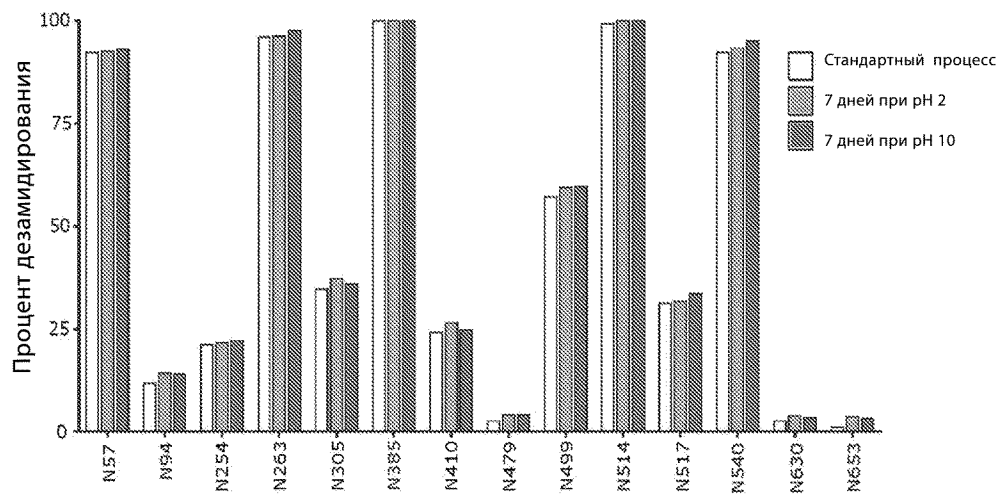
Фиг. 3D

Фиг. 3Е

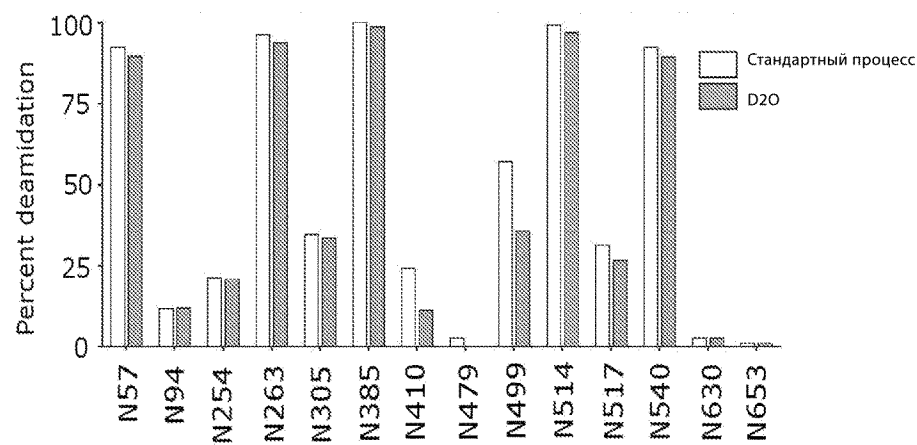
Фиг. 4А



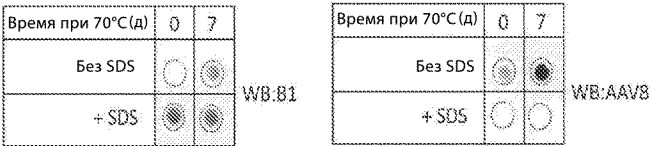
Фиг. 4В



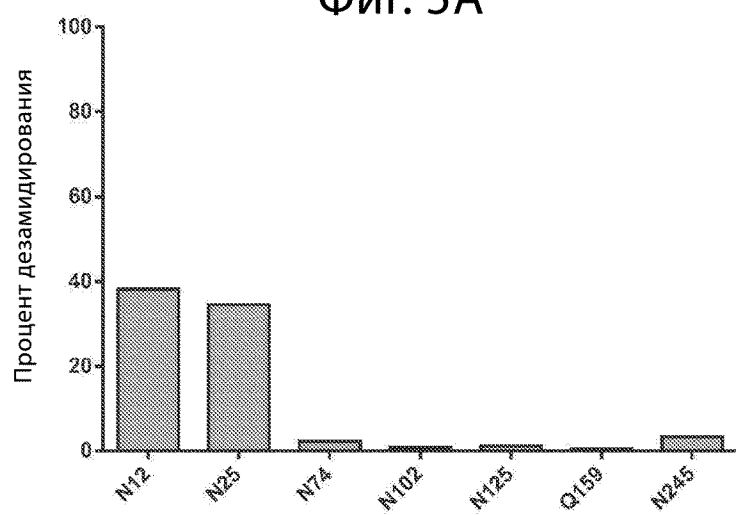
Фиг. 4С



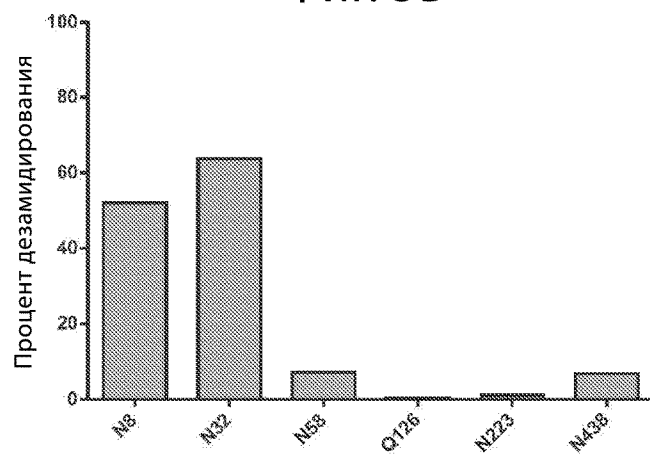
Фиг. 4D



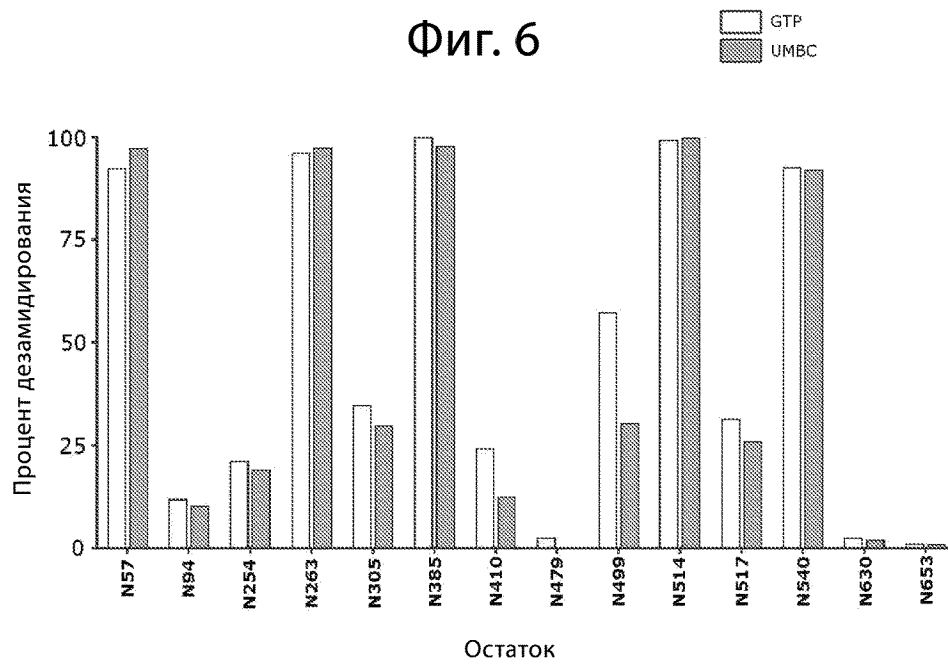
Фиг. 5А



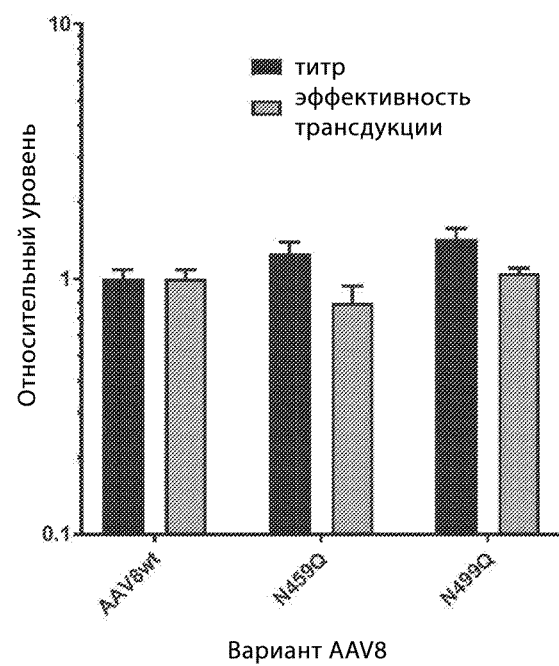
Фиг. 5В



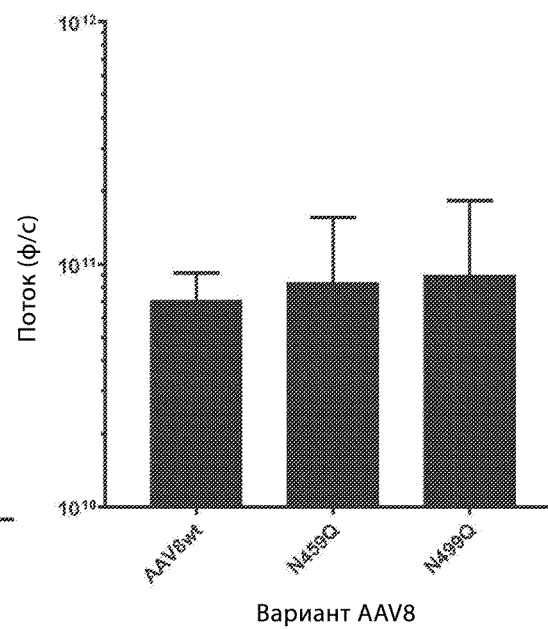
Фиг. 6

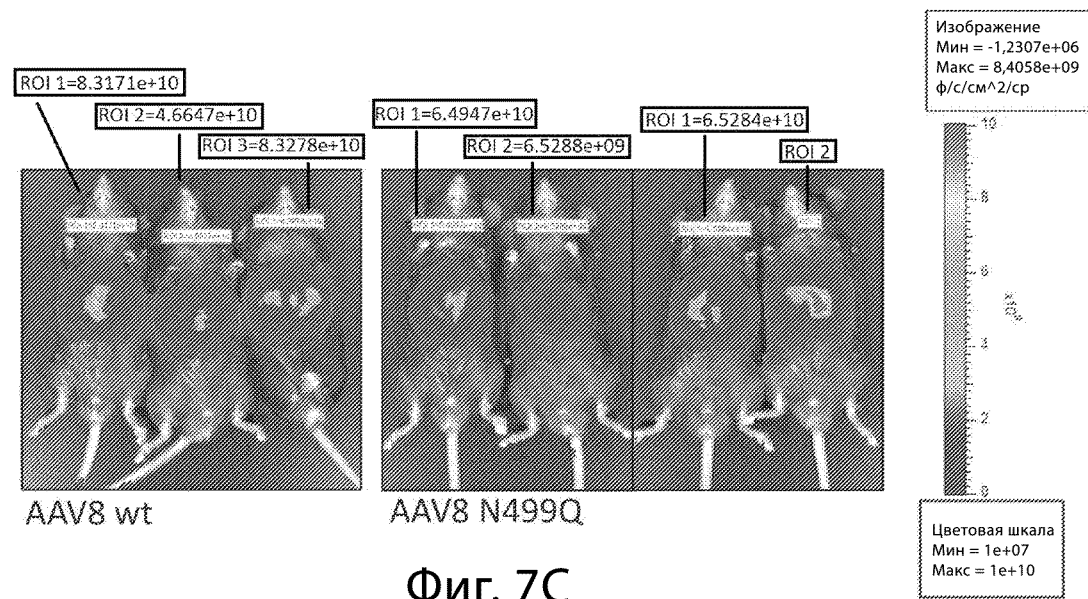


Фиг. 7А

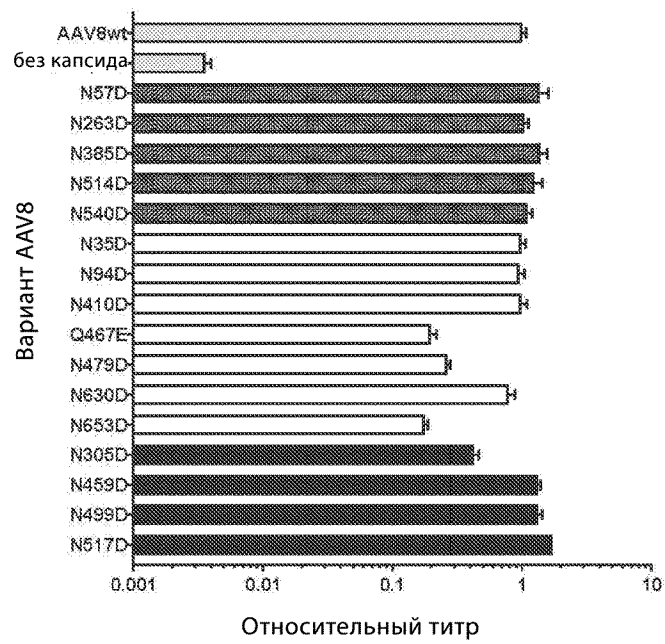


Фиг. 7В

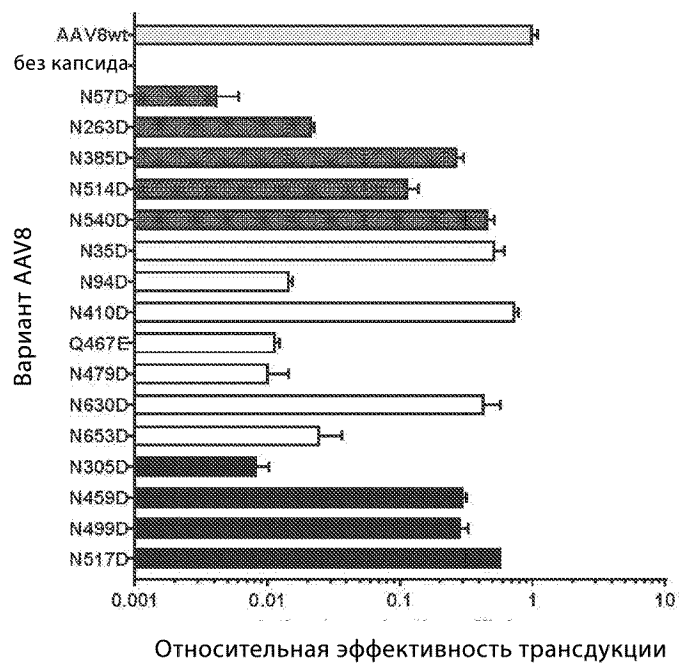




Фиг. 8А



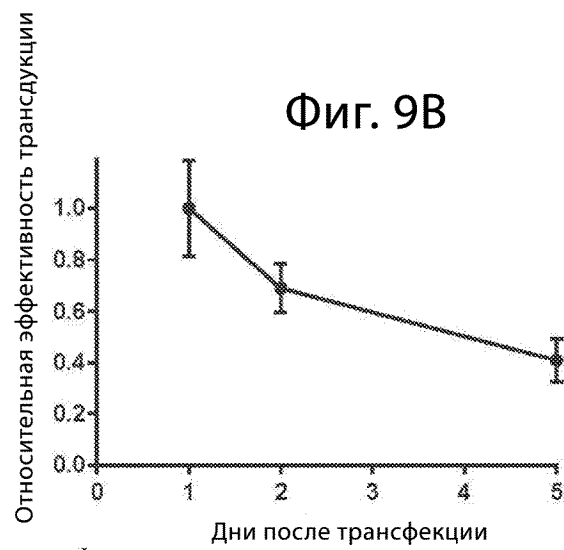
Фиг. 8В



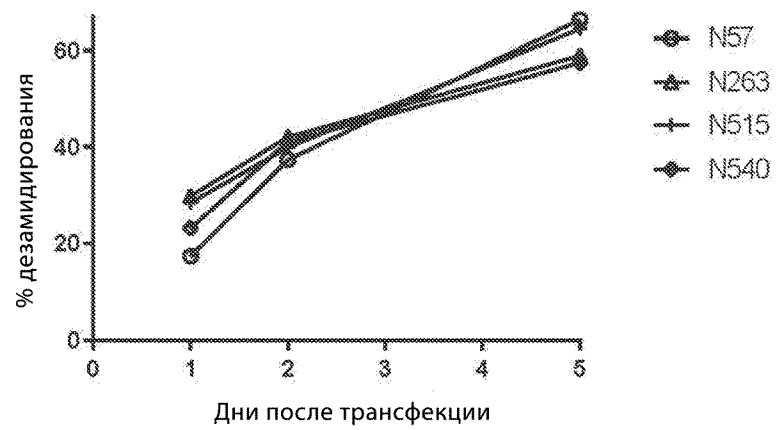
Фиг. 9А



Фиг. 9В



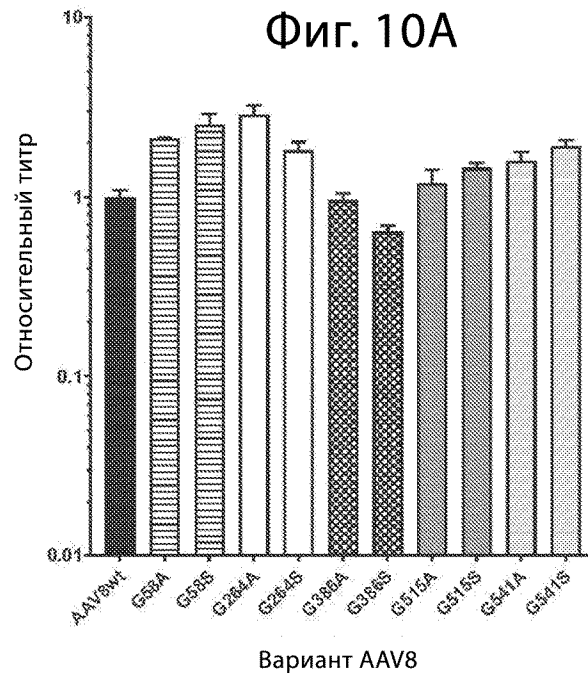
Фиг. 9С



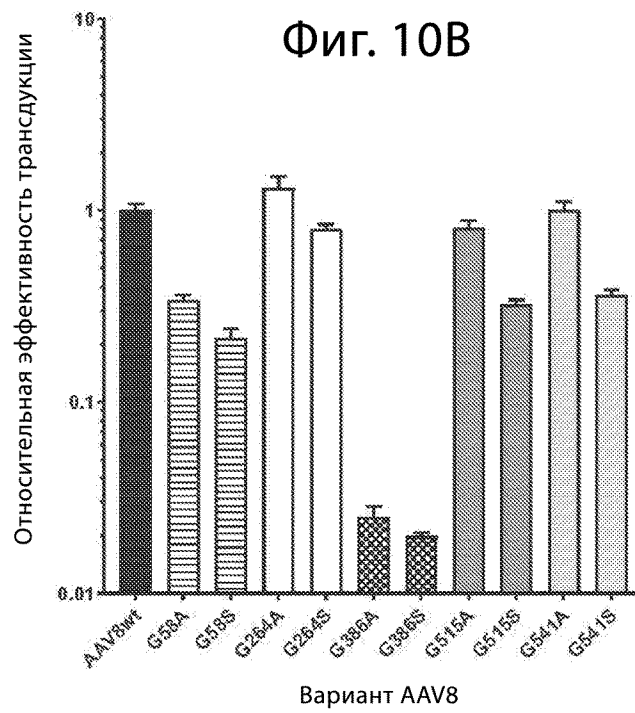
Фиг. 9D

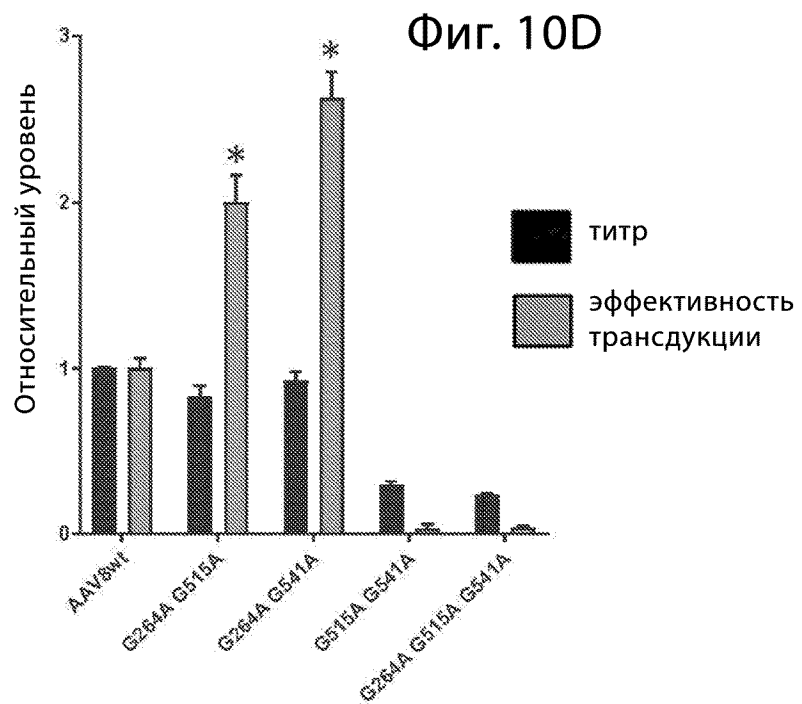
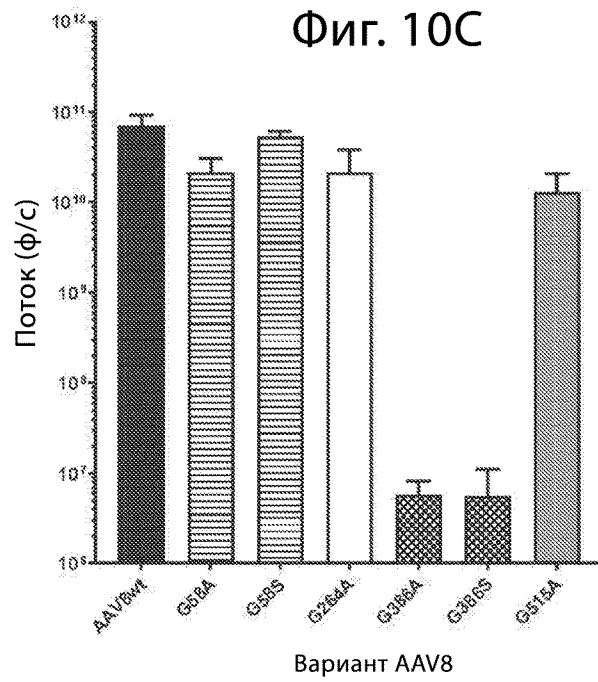


Фиг. 10А

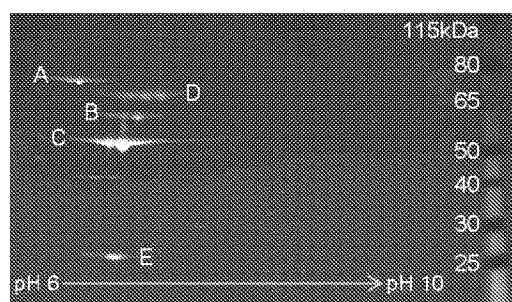


Фиг. 10В

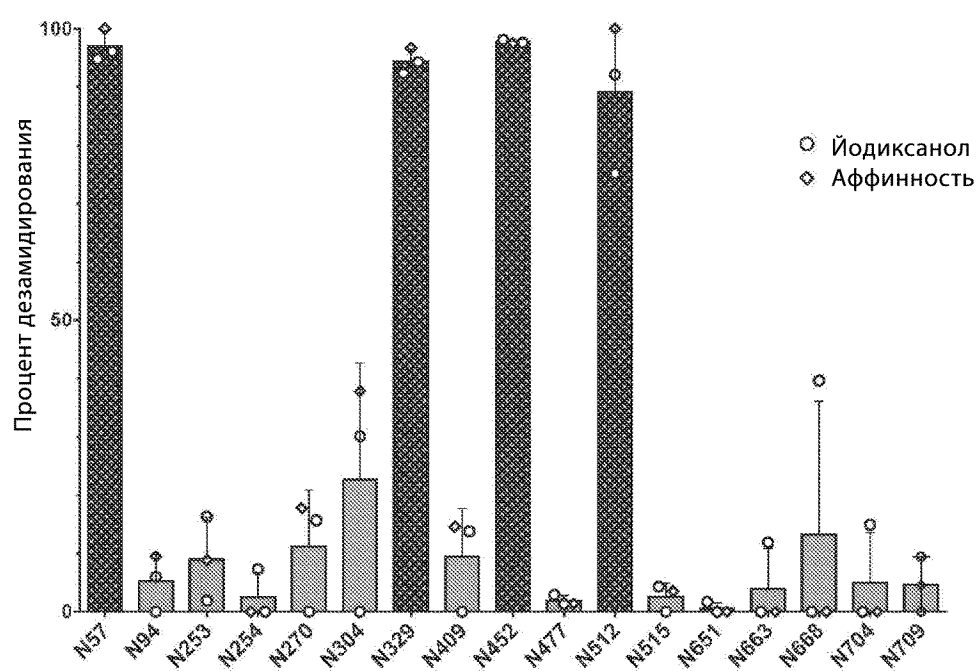
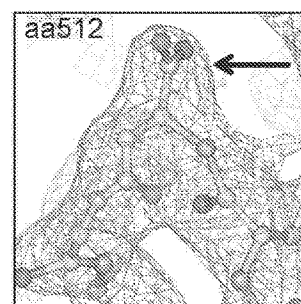




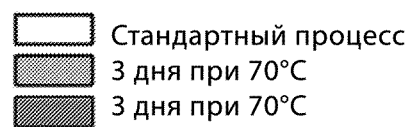
Фиг. 11А



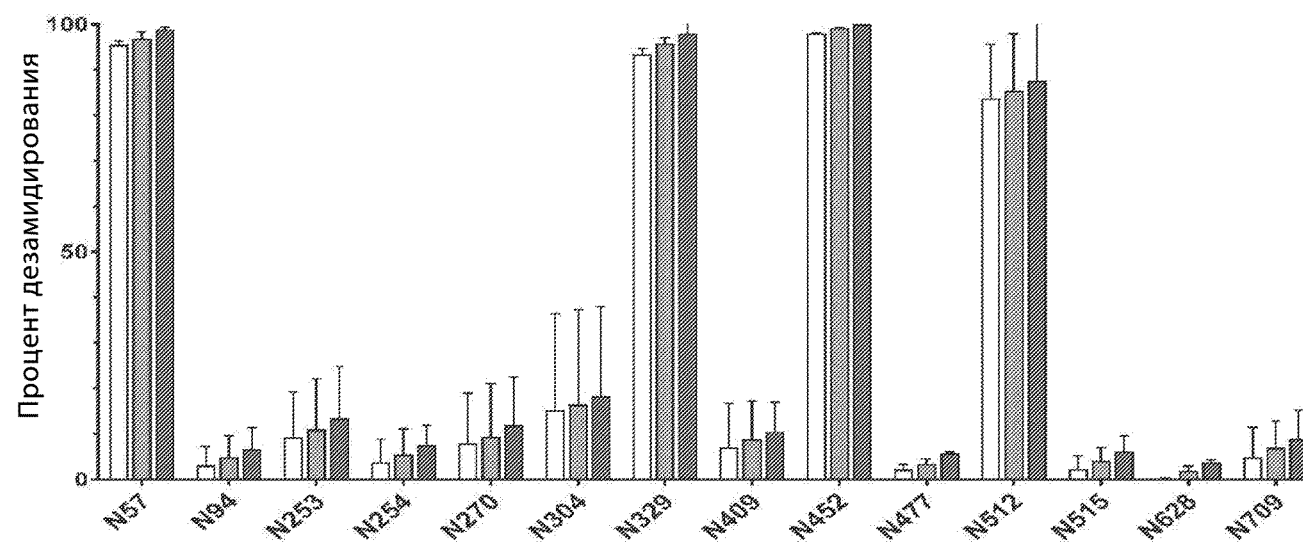
Фиг. 11С



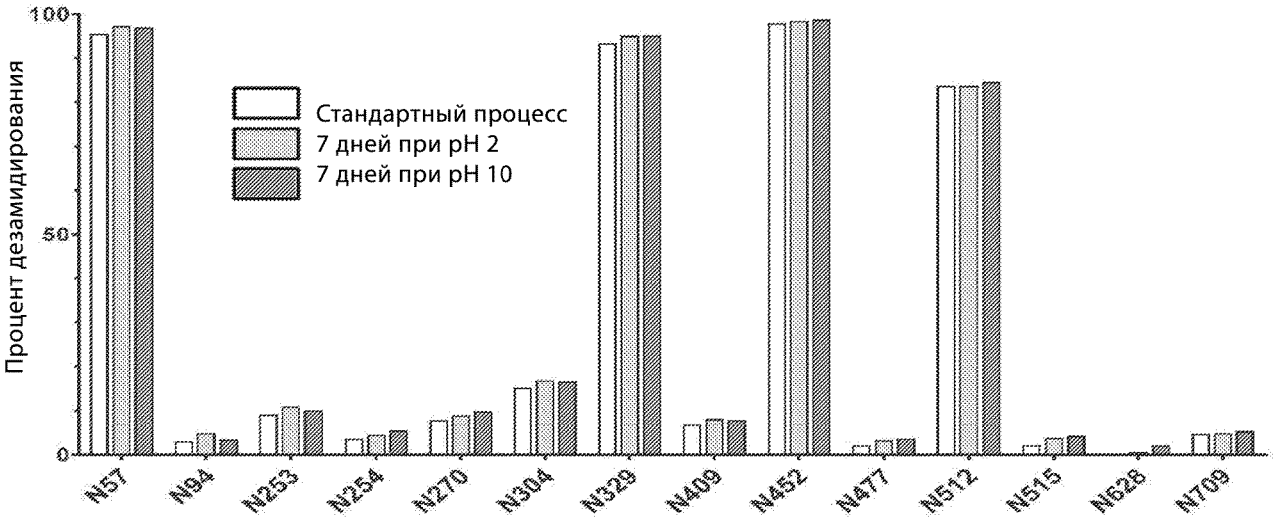
Фиг. 11В



Фиг. 11D



Фиг. 11Е

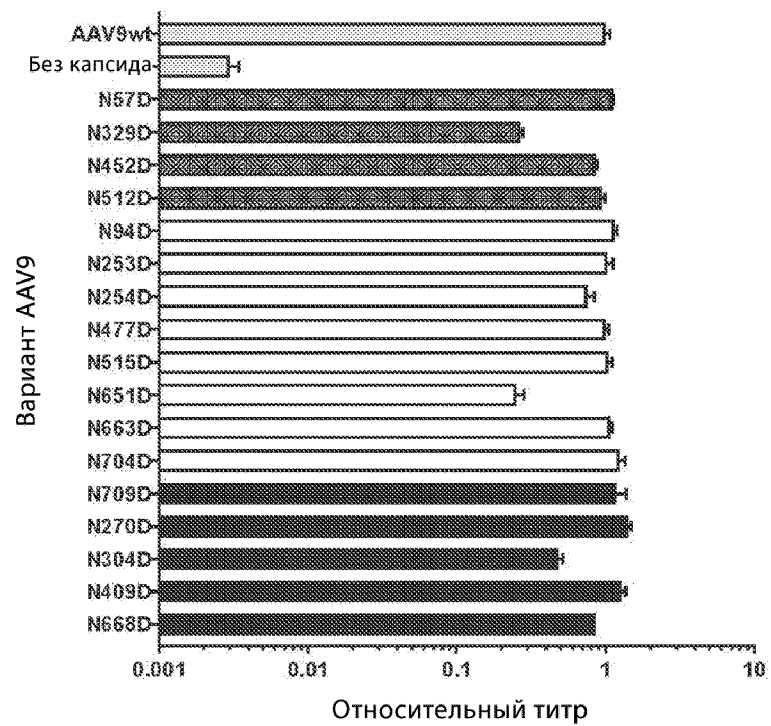


Фиг. 11F

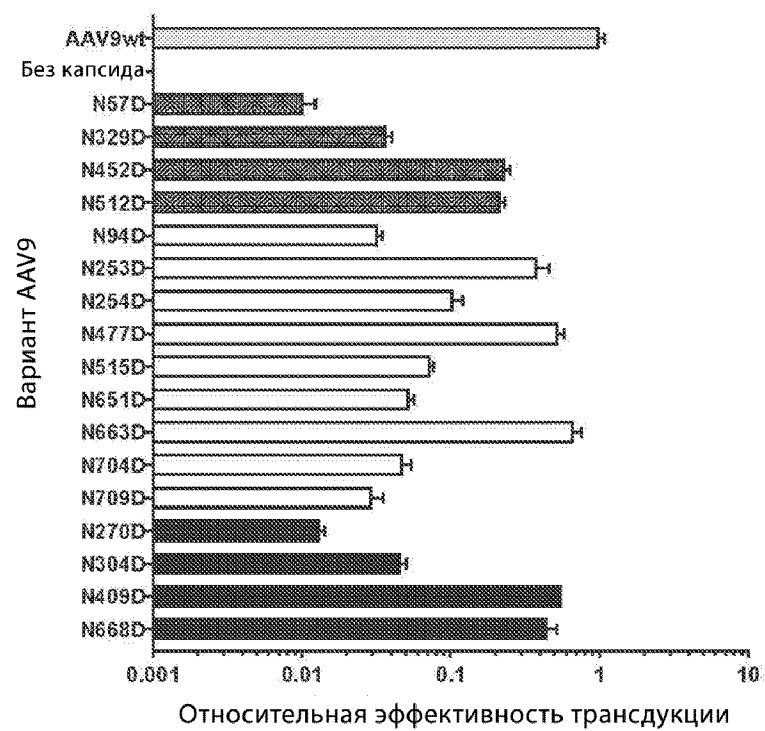
| Серотип            | AAV9 |   |
|--------------------|------|---|
|                    | 0    | 7 |
| Время при 70°C (д) |      |   |
| Без SDS            |      |   |
| + SDS              |      |   |

WB:B1

Фиг. 11G



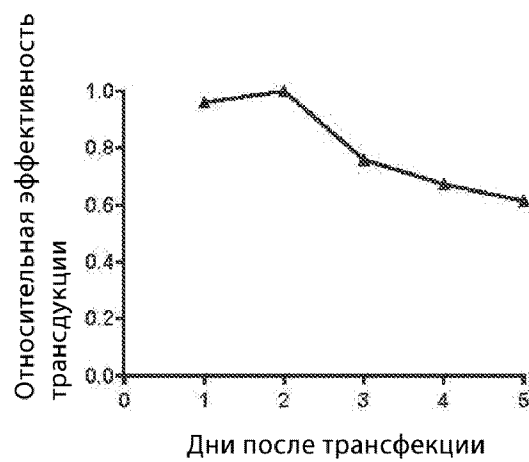
Фиг. 11H



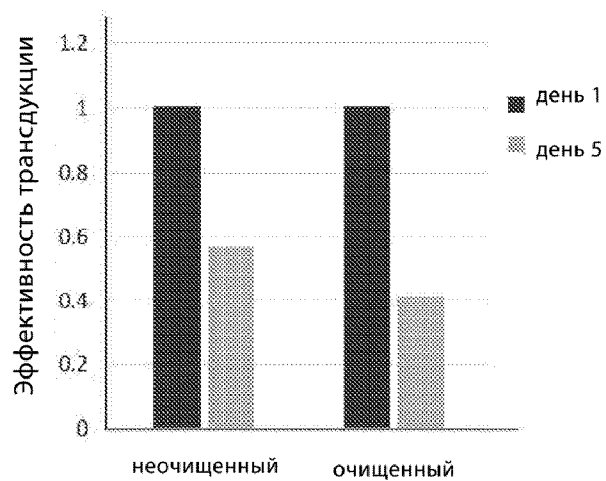
Фиг. 11I



Фиг. 11J



Фиг. 11K



# Фиг. 12А

## (Класс F aa)

| Начало vp1

AAVG5 1 MSFVDHPPDWLEE - VGEGLREFLGLGAGPPKPKPNQQHQDQARGLVLPGYNYLPGPNGLDRGEPVNRADDEVAREHDISYNEQLEAGDNPYLKYNHADAEF  
 AAV9 1 MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLPGPNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAEF  
 PHP.B 1 MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLPGPNGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAEF

| Начало vp2

AAVG5 101 QEKLADDTSGGNGLGKAVFQAKKRVLEPFGLVEEGAKTAPTGRIDHFPKRKKARTEED---SKPS-----TSSDAEAGPSGSQQLQIPAPASSLG  
 AAV9 101 QERLKEDTSGGNGLGRAVFAKRLLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSAGIGKSGAQPAKKRLNFGQTGDTEs - VPDQPPIGEPPAAPSGVG  
 PHP.B 101 QERLKEDTSGGNGLGRAVFAKRLLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSVGIGKSGAQPAKKRLNFGQTGDTEs - VPDQPPIGEPPAAPSGVG

| Начало vp3

AAVG5 201 ADTMASGGGAPVADNNEGADGVSSSGNWHCDsQWLGDREVITSTRTWALPTYNNHLYKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQ  
 AAV9 201 SLTMASGGGAPVADNNEGADGVSSSGNWHCDsQWLGDREVITSTRTWALPTYNNHLYKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQ  
 PHP.B 201 SLTMASGGGAPVADNNEGADGVSSSGNWHCDsQWLGDREVITSTRTWALPTYNNHLYKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQ

AAVG5 301 RLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTDNNGVKTIANNLTSTVQVFTDSYQLPYVLGSAHEGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNDGSQAVGRSSFYCLEY  
 AAV9 301 RLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTDNNGVKTIANNLTSTVQVFTDSYQLPYVLGSAHEGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNDGSQAVGRSSFYCLEY  
 PHP.B 301 RLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTDNNGVKTIANNLTSTVQVFTDSYQLPYVLGSAHEGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNDGSQAVGRSSFYCLEY

AAVG5 401 FPSQMLRTGNNFQFSYEFENVFFHSSYAHsQSLDRLMNPLIDQYLYLSKTINGSGQNQQLKFSVAGPSNMAVQGRNYIPGPSYRQQRVSTTVTQNNNS  
 AAV9 401 FPSQMLRTGNNFQFSYEFENVFFHSSYAHsQSLDRLMNPLIDQYLYLSKTINGSGQNQQLKFSVAGPSNMAVQGRNYIPGPSYRQQRVSTTVTQNNNS  
 PHP.B 401 FPSQMLRTGNNFQFSYEFENVFFHSSYAHsQSLDRLMNPLIDQYLYLSKTINGSGQNQQLKFSVAGPSNMAVQGRNYIPGPSYRQQRVSTTVTQNNNS

AAVG5 501 EFAWPGASSWALNGRNSLMNPGPAMASHKEGEDRFFPLSGSLIFGKQGTGRDNVDADKVMITNEEEIKTTNPVATESYGGQVATNHQSAQ-----AQAQ  
 AAV9 501 EFAWPGASSWALNGRNSLMNPGPAMASHKEGEDRFFPLSGSLIFGKQGTGRDNVDADKVMITNEEEIKTTNPVATESYGGQVATNHQSAQ-----AQAQ  
 PHP.B 501 EFAWPGASSWALNGRNSLMNPGPAMASHKEGEDRFFPLSGSLIFGKQGTGRDNVDADKVMITNEEEIKTTNPVATESYGGQVATNHQSAQ-----AQAQ

AAVG5 601 TGWVQNQGILPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGMKHPPQPILIKNTPVPADPPTAFNKDKLNSFITQYSTGQVSVIEIEWELQKENS  
 AAV9 601 TGWVQNQGILPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGMKHPPQPILIKNTPVPADPPTAFNKDKLNSFITQYSTGQVSVIEIEWELQKENS  
 PHP.B 601 TGWVQNQGILPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGMKHPPQPILIKNTPVPADPPTAFNKDKLNSFITQYSTGQVSVIEIEWELQKENS

AAVG5 701 KRWNPETQYTSNYYKSNVFEAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL  
 AAV9 701 KRWNPETQYTSNYYKSNVFEAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL  
 PHP.B 701 KRWNPETQYTSNYYKSNVFEAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRNLMAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLPGG

## Фиг. 12В (Класс F nt)

|           |                                                                                                        |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| AAVG5 1   | atgtcttttgttgatcacctccagattgg--ttggaagaagttggtgaaggctcttcgcgagtttttgggccttgaagcgggcccaccgaaacccaaaac   |
| PHP.B 1   | atggctgccgatgggttatcttccagattggctcgaggacaaccttagtgaaggaattcgcgagtggtgggctttgaaacctggagccccctcaacccaagg |
| AAV9 1    | atggctgccgatgggttatcttccagattggctcgaggacaaccttagtgaaggaattcgcgagtggtgggctttgaaacctggagccccctcaacccaagg |
| hu68 1    | atggctgccgatgggttatcttccagattggctcgaggacaacctcagtgaaggcattcgcgagtggtgggctttgaaacctggagccccctcaacccaagg |
| AAVG5 101 | ccaatcagcagcatcaagatcaagccccgtggtcttgtgctgcctggttataactatctcggacccggaaacgggtctcgatcgaggagagcctgtcaacag |
| PHP.B 101 | caaatcaacaacatcaagacaacgctcgcaggtcttgtgcttcggggttacaataccttggacccggcaacggactcgacaagggggagccggtcaacgc   |
| AAV9 101  | caaatcaacaacatcaagacaacgctcgcaggtcttgtgcttcggggttacaataccttggacccggcaacggactcgacaagggggagccggtcaacgc   |
| hu68 101  | caaatcaacaacatcaagacaacgctcggggtcttgtgcttcggggttacaataccttggacccggcaacggactcgacaagggggagccggtcaacga    |
| AAVG5 201 | ggcagacgaggtcgcgcgagagcacgacatctcgtacaacgagcagcttgaggcgggagacaacccctacctcaagtacaaccacgcccagcgcgagttt   |
| PHP.B 201 | agcagacgcggcgccctcgagcacgacaaggcctacgaccagcagctcaaggccggagacaacccgtacctcaagtacaaccacgcccagcgcgagttc    |
| AAV9 201  | agcagacgcggcgccctcgagcacgacaaggcctacgaccagcagctcaaggccggagacaacccgtacctcaagtacaaccacgcccagcgcgagttc    |
| hu68 201  | agcagacgcggcgccctcgagcacgacaaggcctacgaccagcagctcaaggccggagacaacccgtacctcaagtacaaccacgcccagcgcgagttc    |
| AAVG5 301 | caggagaagctcgccgacgacacatccttcgggggaaacctcggaaaggcagctcttcaggccaagaaaagggttctcgaaaccttttggcctggttgaag  |
| PHP.B 301 | caggagcggctcaaagaagatacgtcttttgggggcaacctcgggcgagcagctcttcaggccaagaaaagggttcttgaaacctcttggtctggttgaag  |
| AAV9 301  | caggagcggctcaaagaagatacgtcttttgggggcaacctcgggcgagcagctcttcaggccaagaaaagggttcttgaaacctcttggtctggttgaag  |
| hu68 301  | caggagcggctcaaagaagatacgtcttttgggggcaacctcgggcgagcagctcttcaggccaagaaaagggttcttgaaacctcttggtctggttgaag  |
| AAVG5 401 | agggtgctaagacggccccctaccggaagcggatagacgaccactttccaaaagaagaaggcccggaacgaaggagactcca-----a-----          |
| PHP.B 401 | aagcgggctaagacggctcctggaagaagaggcctgtagagcagctctcctcaggaaacggactcctcgcgggtattggcaaatcgggtgcacagccgc    |
| AAV9 401  | aagcgggctaagacggctcctggaagaagaggcctgtagagcagctctcctcaggaaacggactcctcgcgggtattggcaaatcgggtgcacagccgc    |
| hu68 401  | aagcgggctaagacggctcctggaagaagaggcctgtagagcagctctcctcaggaaacggactcctcgcgggtattggcaaatcgggtgcacagccgc    |
| AAVG5 501 | -----gccttcacactcgtcagacgcgaagctggaccagcggatcccagcagctgcaaatccagcccaaccagcctcaagtttgggagct             |
| PHP.B 501 | taaaaagagactcaatttcggtcagactggcgacacagagtcagtcaccagaccctcaaccaatcggagaacctcccgagccccctcaggtgtgggatct   |
| AAV9 501  | taaaaagagactcaatttcggtcagactggcgacacagagtcagtcaccagaccctcaaccaatcggagaacctcccgagccccctcaggtgtgggatct   |
| hu68 501  | taaaaagagactcaatttcggtcagactggcgacacagagtcagtcaccagaccctcaaccaatcggagaacctcccgagccccctcaggtgtgggatct   |

## Фиг. 12С (Класс F nt – cont'd)

|            |                                                                                                        |
|------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| AAVG5 601  | gatacaatggcttcaggtggtggcgaccagtggtgagacaataacgaaggtgccgatggagtgggtagttcctcgggaaattggcattgagattcccaat   |
| PHP.B 601  | cttacaatggcttcaggtggtggcgaccagtggtgagacaataacgaaggtgccgatggagtgggtagttcctcgggaaattggcattgagattcccaat   |
| AAV9 601   | cttacaatggcttcaggtggtggcgaccagtggtgagacaataacgaaggtgccgatggagtgggtagttcctcgggaaattggcattgagattcccaat   |
| hu68 601   | cttacaatggcttcaggtggtggcgaccagtggtgagacaataacgaaggtgccgatggagtgggtagttcctcgggaaattggcattgagattcccaat   |
| AAVG5 701  | ggctgggggacagagtcacaccaccagcaccggaacctgggcccctgccacctaacaacaatcacctctacaagcaaatctccaacagcacatctggagg   |
| PHP.B 701  | ggctgggggacagagtcacaccaccagcaccggaacctgggcccctgccacctaacaacaatcacctctacaagcaaatctccaacagcacatctggagg   |
| AAV9 701   | ggctgggggacagagtcacaccaccagcaccggaacctgggcccctgccacctaacaacaatcacctctacaagcaaatctccaacagcacatctggagg   |
| hu68 701   | ggctgggggacagagtcacaccaccagcaccggaacctgggcccctgccacctaacaacaatcacctctacaagcaaatctccaacagcacatctggagg   |
| AAVG5 801  | atcttcaaatgacaacgcctacttcgggtacagcaccacctgggggtatcttgacttcaacagattccactgccacttctcaccacgtgactggcagcga   |
| PHP.B 801  | atcttcaaatgacaacgcctacttcgggtacagcaccacctgggggtatcttgacttcaacagattccactgccacttctcaccacgtgactggcagcga   |
| AAV9 801   | atcttcaaatgacaacgcctacttcgggtacagcaccacctgggggtatcttgacttcaacagattccactgccacttctcaccacgtgactggcagcga   |
| hu68 801   | atcttcaaatgacaacgcctacttcgggtacagcaccacctgggggtatcttgacttcaacagattccactgccacttctcaccacgtgactggcagcga   |
| AAVG5 901  | ctcatcaacaacaactggggattccggcctaagcgactcaacttcaagctcttcaacattcaggtcaaagaggttacggacaacaatggagtcaagacca   |
| PHP.B 901  | ctcatcaacaacaactggggattccggcctaagcgactcaacttcaagctcttcaacattcaggtcaaagaggttacggacaacaatggagtcaagacca   |
| AAV9 901   | ctcatcaacaacaactggggattccggcctaagcgactcaacttcaagctcttcaacattcaggtcaaagaggttacggacaacaatggagtcaagacca   |
| hu68 901   | ctcatcaacaacaactggggattccggcctaagcgactcaacttcaagctcttcaacattcaggtcaaagaggttacggacaacaatggagtcaagacca   |
| AAVG5 1001 | tcgccaataaccttaccagcacggtccaggtcttccaggactcagactatcagctcccgtacgtgctcggttcgggtcggtcagaggggtgctcccgcggtt |
| PHP.B 1001 | tcgccaataaccttaccagcacggtccaggtcttccaggactcagactatcagctcccgtacgtgctcggttcgggtcggtcagaggggtgctcccgcggtt |
| AAV9 1001  | tcgccaataaccttaccagcacggtccaggtcttccaggactcagactatcagctcccgtacgtgctcggttcgggtcggtcagaggggtgctcccgcggtt |
| hu68 1001  | tcgccaataaccttaccagcacggtccaggtcttccaggactcagactatcagctcccgtacgtgctcggttcgggtcggtcagaggggtgctcccgcggtt |
| AAVG5 1101 | cccagcggacgttttcatgattcctcagtagcgggtatctgacgcttaatgatggaagccaggccggtgggtcggttcgtccttttactgctggaatatttc |
| PHP.B 1101 | cccagcggacgttttcatgattcctcagtagcgggtatctgacgcttaatgatggaagccaggccggtgggtcggttcgtccttttactgctggaatatttc |
| AAV9 1101  | cccagcggacgttttcatgattcctcagtagcgggtatctgacgcttaatgatggaagccaggccggtgggtcggttcgtccttttactgctggaatatttc |
| hu68 1101  | cccagcggacgttttcatgattcctcagtagcgggtatctgacgcttaatgatggaagccaggccggtgggtcggttcgtccttttactgctggaatatttc |
| AAVG5 1201 | ccgtcgcaaatgctaagaacgggtaacaacttccagttcagctacgagtttgagaacgtacctttccatagcagctacgctcacagccaaagcctggacc   |
| PHP.B 1201 | ccgtcgcaaatgctaagaacgggtaacaacttccagttcagctacgagtttgagaacgtacctttccatagcagctacgctcacagccaaagcctggacc   |
| AAV9 1201  | ccgtcgcaaatgctaagaacgggtaacaacttccagttcagctacgagtttgagaacgtacctttccatagcagctacgctcacagccaaagcctggacc   |
| hu68 1201  | ccgtcgcaaatgctaagaacgggtaacaacttccagttcagctacgagtttgagaacgtacctttccatagcagctacgctcacagccaaagcctggacc   |

## Фиг. 12D (Класс F nt – cont'd)

AAVG5 1301 gactaatgaatccactcatcgaccaatacttgtactatctctcaaagactattaacggttctggacagaatcaacaaacgctaaaattcagtggtggccgg  
 PHP.B 1301 gactaatgaatccactcatcgaccaatacttgtactatctctctagaactattaacggttctggacagaatcaacaaacgctaaaattcagtggtggccgg  
 AAV9 1301 gactaatgaatccactcatcgaccaatacttgtactatctctcaaagactattaacggttctggacagaatcaacaaacgctaaaattcagtggtggccgg  
 hu68 1301 gactcatgaatccactcatcgaccaatacttgtactatctctcaaagactattaacggttctggacagaatcaacaaacgctaaaattcagtggtggccgg

AAVG5 1401 acccagcaacatggctgtccagggaagaaactacataacctggaccagctaccgacaacaacgtgtctcaaccactgtgactcaaaacaacaacagcgaa  
 PHP.B 1401 acccagcaacatggctgtccagggaagaaactacataacctggaccagctaccgacaacaacgtgtctcaaccactgtgactcaaaacaacaacagcgaa  
 AAV9 1401 acccagcaacatggctgtccagggaagaaactacataacctggaccagctaccgacaacaacgtgtctcaaccactgtgactcaaaacaacaacagcgaa  
 hu68 1401 acccagcaacatggctgtccagggaagaaactacataacctggaccagctaccgacaacaacgtgtctcaaccactgtgactcaaaacaacaacagcgaa

AAVG5 1501 tttgcttggcctggagcttcttcttgggctctcaatggacgtaatagcttgatgaatcctggacctgctatggccagccacaaagaaggagaggaccgtt  
 PHP.B 1501 tttgcttggcctggagcttcttcttgggctctcaatggacgtaatagcttgatgaatcctggacctgctatggccagccacaaagaaggagaggaccgtt  
 AAV9 1501 tttgcttggcctggagcttcttcttgggctctcaatggacgtaatagcttgatgaatcctggacctgctatggccagccacaaagaaggagaggaccgtt  
 hu68 1501 tttgcttggcctggagcttcttcttgggctctcaatggacgtaatagcttgatgaatcctggacctgctatggccagccacaaagaaggagaggaccgtt

AAVG5 1601 tctttctcttctgtctggatctttaattttggcaaaacaggaactggaagagacaacgtggatgcggaacaaagtcataacccaacgaagaagaattaa  
 PHP.B 1601 tctttctcttctgtctggatctttaattttggcaaaacaggtaccggcagagacaacgtggatgcggaacaaagtcataacccaacgaagaagaattaa  
 AAV9 1601 tctttctcttctgtctggatctttaattttggcaaaacaggaactggaagagacaacgtggatgcggaacaaagtcataacccaacgaagaagaattaa  
 hu68 1601 tctttctcttctgtctggatctttaattttggcaaaacaggaactggaagagacaacgtggatgcggaacaaagtcataacccaacgaagaagaattaa

AAVG5 1701 aactactaaccggtagcaacggagtcctatggacaagtggccacaaaccaccagagtgcaccaag-----cacaggcgagacc  
 PHP.B 1701 aactactaaccggtagcaacggagtcctatggacaagtggccacaaaccaccagagtgcaccaactttggcggtgccttttaaggcagagcgagacc  
 AAV9 1701 aactactaaccggtagcaacggagtcctatggacaagtggccacaaaccaccagagtgcaccaag-----cacaggcgagacc  
 hu68 1701 aactaccaaccagtagcaacggagtcctatggacaagtggccacaaaccaccagagtgcaccaag-----cacaggcgagacc

AAVG5 1801 ggctgggttcaaaaccaaggaatacttccgggtatggtttggcaggacagagatgtgtacctgcaaggacccatttgggccaatttctcacacggacg  
 PHP.B 1801 ggctgggttcaaaaccaaggaatacttccgggtatggtttggcaggacagagatgtgtacctgcaaggacccatttgggccaatttctcacacggacg  
 AAV9 1801 ggctgggttcaaaaccaaggaatacttccgggtatggtttggcaggacagagatgtgtacctgcaaggacccatttgggccaatttctcacacggacg  
 hu68 1801 ggctgggttcaaaaccaaggaatacttccgggtatggtttggcaggacagagatgtgtacctgcaaggacccatttgggccaatttctcacacggacg

## Фиг. 12Е (Класс F nt – cont'd)

|       |      |                                                                                                      |
|-------|------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| AAVG5 | 1901 | gcaactttcacccttctccgctgatgggaggggttggaatgaagcaccgcctcctcagatcctcatcaaaaacacacctgtacctgcggtacctccaac  |
| PHP.B | 1901 | gcaactttcacccttctccgctgatgggaggggttggaatgaagcaccgcctcctcagatcctcatcaaaaacacacctgtacctgcggtacctccaac  |
| AAV9  | 1901 | gcaactttcacccttctccgctgatgggaggggttggaatgaagcaccgcctcctcagatcctcatcaaaaacacacctgtacctgcggtacctccaac  |
| hu68  | 1901 | gcaactttcacccttctccgctgatgggaggggttggaatgaagcaccgcctcctcagatcctcatcaaaaacacacctgtacctgcggtacctccaac  |
| AAVG5 | 2001 | ggccttcaacaaggacaagctgaactctttcatcaccagttattctactggccaagtcagcgtggagatcgagtgggagctgcagaaggaaaacagcaag |
| PHP.B | 2001 | ggccttcaacaaggacaagctgaactctttcatcaccagttattctactggccaagtcagcgtggagatcgagtgggagctgcagaaggaaaacagcaag |
| AAV9  | 2001 | ggccttcaacaaggacaagctgaactctttcatcaccagttattctactggccaagtcagcgtggagatcgagtgggagctgcagaaggaaaacagcaag |
| hu68  | 2001 | ggccttcaacaaggacaagctgaactctttcatcaccagttattctactggccaagtcagcgtggagattgagtgggagctgcagaaggaaaacagcaag |
| AAVG5 | 2101 | cgctggaaccgagatccagtacacttccaactattacaagtctaataatgttgatttgctgttaataactgaaggtgtatatagtgaaccccgcccca   |
| PHP.B | 2101 | cgctggaaccgagatccagtacacttccaactattacaagtctaataatgttgatttgctgttaataactgaaggtgtatatagtgaaccccgcccca   |
| AAV9  | 2101 | cgctggaaccgagatccagtacacttccaactattacaagtctaataatgttgatttgctgttaataactgaaggtgtatatagtgaaccccgcccca   |
| hu68  | 2101 | cgctggaaccgagatccagtacacttccaactattacaagtctaataatgttgatttgctgttaataactgaaggtgtttattctgaaccccgcccca   |
| AAVG5 | 2201 | ttggcaccagatacctgactcgtaatctg                                                                        |
| PHP.B | 2201 | ttggcaccagatacctgactcgtaatctg                                                                        |
| AAV9  | 2201 | ttggcaccagatacctgactcgtaatctg                                                                        |
| hu68  | 2201 | ttggcaccagatacctgactcgtaatctg                                                                        |

## Фиг. 13А (AAV8)

|           |                                                                                                       |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|           | Начало vp1                                                                                            |
| AAV8T 1   | MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWALKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFGNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLQAGDNPYLRYNHADAEF  |
| AAVG3 1   | MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWALKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFGNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLQAGDNPYLRYNHADAEF  |
| AAV8 1    | MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWALKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFGNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLQAGDNPYLRYNHADAEF  |
|           | Начало vp2                                                                                            |
| AAV8T 101 | QERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEPSPQSPDSSTGIGKKGQQPARKRLNFGQTGDSESVDPQPLGEPAPPSGVG     |
| AAVG3 101 | QERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEPSPQSPDSSTGIGKKGQQPARKRLNFGQTGDSESVDPQPLGEPAPPSGVG     |
| AAV8 101  | QERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEPSPQSPDSSTGIGKKGQQPARKRLNFGQTGDSESVDPQPLGEPAPPSGVG     |
|           | Начало vp3                                                                                            |
| AAV8T 201 | PNTMAAGGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGDRVITTTSTRTWALPTYNNHLYKQISSGTHGATNDNTYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSPRDWQ   |
| AAVG3 201 | PNTMAAGGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGDRVITTTSTRTWALPTYNNHLYKQISSGTHGATNDNTYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSPRDWQ   |
| AAV8 201  | PNTMAAGGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGDRVITTTSTRTWALPTYNNHLYKQISSGTHGATNDNTYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSPRDWQ   |
| AAV8T 301 | RLINNNWGFRPKRLSFKLFNIQVKEVTQNEGTKTIANNLTSTIQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEY  |
| AAVG3 301 | RLINNNWGFRPKRLSFKLFNIQVKEVTQNEGTKTIANNLTSTIQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEY  |
| AAV8 301  | RLINNNWGFRPKRLSFKLFNIQVKEVTQNEGTKTIANNLTSTIQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEY  |
| AAV8T 401 | FPSQMLRTGNNFQFTYTFEDVFPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTQTGGSRPTQTLGFSQGGPNTMANQAKNWLPGPCYRQQRVSTTTGQNNN   |
| AAVG3 401 | FPSQMLRTGNNFQFTYTFEDVFPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTQTGGTANTQTLGFSQGGPNTMANQAKNWLPGPCYRQQRVSTTTGQNNN   |
| AAV8 401  | FPSQMLRTGNNFQFTYTFEDVFPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTQTGGTANTQTLGFSQGGPNTMANQAKNWLPGPCYRQQRVSTTTGQNNN   |
| AAV8T 501 | SNFAWTAGTKYHLNGRNSLANPGIAMATHKDDEERFFPSNGILIFGKQNAARDNADYSVMLTSEEEIKTTNPVATEEYGIVGDNLQLYNTAPGSVFNVS   |
| AAVG3 501 | SNFAWTAGTKYHLNGRNSLANPGIAMATHKDDEERFFPSNGILIFGKQNAARDNADYSVMLTSEEEIKTTNPVATEEYGIVCDNLQSRNTAPREEIVNS   |
| AAV8 501  | SNFAWTAGTKYHLNGRNSLANPGIAMATHKDDEERFFPSNGILIFGKQNAARDNADYSVMLTSEEEIKTTNPVATEEYGIVADNLQQONTAPQIGTVNS   |
| AAV8T 601 | QGALPGMVWQNRDVYLQGF IWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGLKHPPQILIKNTVPVADPPTTFNQSKLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPE |
| AAVG3 601 | QGALPGMVWQNRDVYLQGF IWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGLKHPPQILIKNTVPVADPPTTFNQSKLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPE |
| AAV8 601  | QGALPGMVWQNRDVYLQGF IWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGLKHPPQILIKNTVPVADPPTTFNQSKLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPE |
| AAV8T 701 | IQYTSNYYKSTSVDFAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL                                                                |
| AAVG3 701 | IQYTSNYYKSTSVDFAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL                                                                |
| AAV8 701  | IQYTSNYYKSTSVDFAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL                                                                |

Фиг. 13В (AAV8)

| Начало vp1  
 AAV8T 1 atggctgccgatgggttatcttccagattggctcgaggacaacctctctgagggcattcgcgagtgggtggcgctgaaacctggagccccgaagcccaag  
 AAVG3 1 atggctgccgatgggttatcttccagattggctcgaggacaacctctctgagggcattcgcgagtgggtggcgctgaaacctggagccccgaagcccaag  
 AAV8 1 atggctgccgatgggttatcttccagattggctcgaggacaacctctctgagggcattcgcgagtgggtggcgctgaaacctggagccccgaagcccaag  
  
 AAV8T 101 ccaaccagcaaaagcaggacgacggccggggtctggtgcttcttggttacaagtacctcggaaccttcaacggactcgacaagggggagcccggtcaacgc  
 AAVG3 101 ccaaccagcaaaagcaggacgacggccggggtctggtgcttcttggttacaagtacctcggaaccttcaacggactcgacaagggggagcccggtcaacgc  
 AAV8 101 ccaaccagcaaaagcaggacgacggccggggtctggtgcttcttggttacaagtacctcggaaccttcaacggactcgacaagggggagcccggtcaacgc  
  
 AAV8T 201 ggcgagcgcagcgccctcgagcagcacaaggcctacgaccagcagctgcaggcggtgacaatccgtacctgcggtataaaccagccgacgcccaggttt  
 AAVG3 201 ggcgagcgcagcgccctcgagcagcacaaggcctacgaccagcagctgcaggcggtgacaatccgtacctgcggtataaaccagccgacgcccaggttt  
 AAV8 201 ggcgagcgcagcgccctcgagcagcacaaggcctacgaccagcagctgcaggcggtgacaatccgtacctgcggtataaaccagccgacgcccaggttt  
  
 AAV8T 301 caggagcgtctgcaagaagatacgtcttttgggggcaacctcgggcgagcagctcttccaggccaagaagcggttctcgaaacctctcggtctggttgagg  
 AAVG3 301 caggagcgtctgcaagaagatacgtcttttgggggcaacctcgggcgagcagctcttccaggccaagaagcggttctcgaaacctctcggtctggttgagg  
 AAV8 301 caggagcgtctgcaagaagatacgtcttttgggggcaacctcgggcgagcagctcttccaggccaagaagcggttctcgaaacctctcggtctggttgagg  
 | Начало vp2  
 AAV8T 401 aaggcgctaagacggctcctggaaagaagagaccggtagagccatcacccagcggttctccagactcctctacgggcatcggaagaaaggccaacagcc  
 AAVG3 401 aaggcgctaagacggctcctggaaagaagagaccggtagagccatcacccagcggttctccagactcctctacgggcatcggaagaaaggccaacagcc  
 AAV8 401 aaggcgctaagacggctcctggaaagaagagaccggtagagccatcacccagcggttctccagactcctctacgggcatcggaagaaaggccaacagcc  
  
 AAV8T 501 cgccagaaaaagactcaattttgggtcagactggcgactcagagtcagttccagacctcaacctctcgagaaacctccagcagcgccctctggtgtggga  
 AAVG3 501 cgccagaaaaagactcaattttgggtcagactggcgactcagagtcagttccagacctcaacctctcgagaaacctccagcagcgccctctggtgtggga  
 AAV8 501 cgccagaaaaagactcaattttgggtcagactggcgactcagagtcagttccagacctcaacctctcgagaaacctccagcagcgccctctggtgtggga  
 | Начало vp3  
 AAV8T 601 cctaatacaatggctgcaggcggtggcgaccaatggcagacaataacgaaggcgccgacggagtggttagttcctcgggaaattggcattgcgattcca  
 AAVG3 601 cctaatacaatggctgcaggcggtggcgaccaatggcagacaataacgaaggcgccgacggagtggttagttcctcgggaaattggcattgcgattcca  
 AAV8 601 cctaatacaatggctgcaggcggtggcgaccaatggcagacaataacgaaggcgccgacggagtggttagttcctcgggaaattggcattgcgattcca  
  
 AAV8T 701 catggctggggcagagagtcattaccaccagcaccggaacctgggcccctgccacctacaacaaccacctctacaagcaaattcctctggtactca---  
 AAVG3 701 catggctggggcagagagtcattaccaccagcaccggaacctgggcccctgccacctacaacaaccacctctacaagcaaattcctcaacgggacatcggg  
 AAV8 701 catggctggggcagagagtcattaccaccagcaccggaacctgggcccctgccacctacaacaaccacctctacaagcaaattcctcaacgggacatcggg  
  
 AAV8T 801 tggagccaccaacgacaacacctacttcggctacagcaccctgggggtattttgactttaacagattccactgccacttttaccacgtgactggcag  
 AAVG3 801 aggagccaccaacgacaacacctacttcggctacagcaccctgggggtattttgactttaacagattccactgccacttttaccacgtgactggcag  
 AAV8 801 aggagccaccaacgacaacacctacttcggctacagcaccctgggggtattttgactttaacagattccactgccacttttaccacgtgactggcag

## Фиг. 13С (AAV8 - cont'd)

AAV8T 901 cgactcatcaacaacaactggggattccggcccaagagactcagcttcaagctcttcaacatccagggtcaaggaggtcacgcagaatgaaggcaccaaga  
AAVG3 901 cgactcatcaacaacaactggggattccggcccaagagactcagcttcaagctcttcaacatccagggtcaaggaggtcacgcagaatgaaggcaccaaga  
AAV8 901 cgactcatcaacaacaactggggattccggcccaagagactcagcttcaagctcttcaacatccagggtcaaggaggtcacgcagaatgaaggcaccaaga

AAV8T 1001 ccacgcgaataaacctcaccagcaccatccagggtgtttacggactcggagtagcagctgccgtacgtttctcggctctgccaccagggtgcctgcctcc  
AAVG3 1001 ccacgcgaataaacctcaccagcaccatccagggtgtttacggactcggagtagcagctgccgtacgtttctcggctctgccaccagggtgcctgcctcc  
AAV8 1001 ccacgcgaataaacctcaccagcaccatccagggtgtttacggactcggagtagcagctgccgtacgtttctcggctctgccaccagggtgcctgcctcc

AAV8T 1101 gttcccgccggacgtgttcatgattccccagtagcggctacctaactcaacaacggtagtcaggccgtgggacgtctctcttctactgctggaatac  
AAVG3 1101 gttcccgccggacgtgttcatgattccccagtagcggctacctaactcaacaacggtagtcaggccgtgggacgtctctcttctactgctggaatac  
AAV8 1101 gttcccgccggacgtgttcatgattccccagtagcggctacctaactcaacaacggtagtcaggccgtgggacgtctctcttctactgctggaatac

AAV8T 1201 tttccttcgcagatgctgagaaccggcaacaacttccagtttacttacaccttcgaggacgtgcctttccacagcagctacgcccacagccagagcttgg  
AAVG3 1201 tttccttcgcagatgctgagaaccggcaacaacttccagtttacttacaccttcgaggacgtgcctttccacagcagctacgcccacagccagagcttgg  
AAV8 1201 tttccttcgcagatgctgagaaccggcaacaacttccagtttacttacaccttcgaggacgtgcctttccacagcagctacgcccacagccagagcttgg

AAV8T 1301 accggtgatgaatcctctgattgaccagtagcctgtactacttgtctcggactcaacaacagggtgggagtaggcctacgcagactctgggcttcagcca  
AAVG3 1301 accggtgatgaatcctctgattgaccagtagcctgtactacttgtctcggactcaacaacagggtgggagtaggcctacgcagactctgggcttcagcca  
AAV8 1301 accggtgatgaatcctctgattgaccagtagcctgtactacttgtctcggactcaacaacagggtgggagtaggcctacgcagactctgggcttcagcca

AAV8T 1401 aggtgggcctaataacaatggccaatcaggcaagaactggctgccaggaccctgttaccgccaacaacgcgtctcaacgacaaccgggcaaaacaacaat  
AAVG3 1401 aggtgggcctaataacaatggccaatcaggcaagaactggctgccaggaccctgttaccgccaacaacgcgtctcaacgacaaccgggcaaaacaacaat  
AAV8 1401 aggtgggcctaataacaatggccaatcaggcaagaactggctgccaggaccctgttaccgccaacaacgcgtctcaacgacaaccgggcaaaacaacaat

AAV8T 1501 agcaactttgcctggactgctgggaccaaataccatctgaatggaagaaattcattggctaatacctggcatcgctatggcaacacacaaagacgacgagg  
AAVG3 1501 agcaactttgcctggactgctgggaccaaataccatctgaatggaagaaattcattggctaatacctggcatcgctatggcaacacacaaagacgacgagg  
AAV8 1501 agcaactttgcctggactgctgggaccaaataccatctgaatggaagaaattcattggctaatacctggcatcgctatggcaacacacaaagacgacgagg

AAV8T 1601 agcgtttttttccagtaacgggatcctgatttttggcaacaaaatgctgccagagacaatgctgattacagcgatgtcatgctcaccagcgaggaaga  
AAVG3 1601 agcgtttttttccagtaacgggatcctgatttttggcaacaaaatgctgccagagacaatgctgattacagcgatgtcatgctcaccagcgaggaaga  
AAV8 1601 agcgtttttttccagtaacgggatcctgatttttggcaacaaaatgctgccagagacaatgctgattacagcgatgtcatgctcaccagcgaggaaga

## Фиг. 13D (AAV8 - cont'd)

AAV8T 1701 aatcaaaaccactaaccctgtggctacagaggaatacgggtatcgtgggtgataaacttgagttgtataacacggctcctggttcggtgtttgtcaacagc  
AAVG3 1701 aatcaaaaccactaaccctgtggctacagaggaatacgggtatcgtgtgtgataaacttgagagtcggaacacggctcctcgtgaggagattgtcaacagc  
AAV8 1701 aatcaaaaccactaaccctgtggctacagaggaatacgggtatcgtggcagataaacttgagcagcaaaacacggctcctcaaatgggaactgtcaacagc

AAV8T 1801 cagggggccttaccgggtatggctctggcagaaccgggacgtgtacctgcaggggtcccatctgggccaagattcctcacacggacggcaacttccaccgt  
AAVG3 1801 cagggggccttaccgggtatggctctggcagaaccgggacgtgtacctgcaggggtcccatctgggccaagattcctcacacggacggcaacttccaccgt  
AAV8 1801 cagggggccttaccgggtatggctctggcagaaccgggacgtgtacctgcaggggtcccatctgggccaagattcctcacacggacggcaacttccaccgt

AAV8T 1901 ctccgctgatggggcgctttggcctgaaacatcctccgcctcagatcctgatcaagaacacgcctgtacctgcggatcctccgaccaccttcaaccagtc  
AAVG3 1901 ctccgctgatggggcgctttggcctgaaacatcctccgcctcagatcctgatcaagaacacgcctgtacctgcggatcctccgaccaccttcaaccagtc  
AAV8 1901 ctccgctgatggggcgctttggcctgaaacatcctccgcctcagatcctgatcaagaacacgcctgtacctgcggatcctccgaccaccttcaaccagtc

AAV8T 2001 aaagctgaactctttcatcacgcaatacagcaccggacaggtcagcgtggaaattgaatgggagctgcagaaggaaaacagcaagcgtggaaccccgag  
AAVG3 2001 aaagctgaactctttcatcacgcaatacagcaccggacaggtcagcgtggaaattgaatgggagctgcagaaggaaaacagcaagcgtggaaccccgag  
AAV8 2001 aaagctgaactctttcatcacgcaatacagcaccggacaggtcagcgtggaaattgaatgggagctgcagaaggaaaacagcaagcgtggaaccccgag

AAV8T 2101 atccagtacacctccaactactacaaatctacaagtgtggactttgctgttaatacagaaggcgtgtactctgaaccccgccccattggcaccggttacc  
AAVG3 2101 atccagtacacctccaactactacaaatctacaagtgtggactttgctgttaatacagaaggcgtgtactctgaaccccgccccattggcaccggttacc  
AAV8 2101 atccagtacacctccaactactacaaatctacaagtgtggactttgctgttaatacagaaggcgtgtactctgaaccccgccccattggcaccggttacc

AAV8T 2201 tcacccgtaatctg  
AAVG3 2201 tcacccgtaatctg  
AAV8 2201 tcacccgtaatctg

## Фиг. 14А (AAVrh10)

|       |     |                                                                                                         |  |
|-------|-----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
|       |     | Начало vp1                                                                                              |  |
| AAVG2 | 1   | MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFGNLDKGEFVNEADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADAEF     |  |
| rh10  | 1   | MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFGNLDKGEFVNEADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADAEF     |  |
| hu37  | 1   | MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFGNLDKGEFVNEADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADAEF     |  |
|       |     | Начало vp2                                                                                              |  |
| AAVG2 | 101 | QERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEPSPQRSPPDSSTGIGKKQQPARKRLNFGQTGDSSESVPDPQPIGEPPAGPSGLG   |  |
| rh10  | 101 | QERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEPSPQRSPPDSSTGIGKKQQPARKRLNFGQTGDSSESVPDPQPIGEPPAGPSGLG   |  |
| hu37  | 101 | QERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEPSPQRSPPDSSTGIGKKQQPARKRLNFGQTGDSSESVPDPQPIGEPPAGPSGLG   |  |
|       |     | Начало vp3                                                                                              |  |
| AAVG2 | 201 | SGTMAAGGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGDVRVITSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGSTNDNTYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSRWDQ      |  |
| rh10  | 201 | SGTMAAGGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGDVRVITSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGSTNDNTYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSRWDQ      |  |
| hu37  | 201 | SGTMAAGGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGDVRVITSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGSTNDNTYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSRWDQ      |  |
| AAVG2 | 301 | RLINNNWGFRPKRLSFKLFNIQVKEVTQNEGKTKTIANNLTSTIQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEY   |  |
| rh10  | 301 | RLINNNWGFRPKRLSFKLFNIQVKEVTQNEGKTKTIANNLTSTIQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEY   |  |
| hu37  | 301 | RLINNNWGFRPKRLSFKLFNIQVKEVTQNEGKTKTIANNLTSTIQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEY   |  |
| AAVG2 | 401 | FPSQMLRTGNNEFFSYTFEDVPFHSSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTQSTGGTQGTQQLLFSQAGPANMSAQAKNWLPGPCYRQQRVSTTSLQNNN    |  |
| rh10  | 401 | FPSQMLRTGNNEFFSYTFEDVPFHSSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTQSTGGTQGTQQLLFSQAGPANMSAQAKNWLPGPCYRQQRVSTTSLQNNN    |  |
| hu37  | 401 | FPSQMLRTGNNEFFSYTFEDVPFHSSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTQSTGGTQGTQQLLFSQAGPANMSAQAKNWLPGPCYRQQRVSTTSLQNNN    |  |
| AAVG2 | 501 | SNFAWTGATKYHLNGRDSLVPNGVAMATHKDDEERFFPSSGVLMTFGKQAGAGRDNDYSSVMLTSEEEIKTTNPVATEQYGVVADNLQQTNTGPIVGNVNS   |  |
| rh10  | 501 | SNFAWTGATKYHLNGRDSLVPNGVAMATHKDDEERFFPSSGVLMTFGKQAGAGRDNDYSSVMLTSEEEIKTTNPVATEQYGVVADNLQQTNTGPIVGNVNS   |  |
| hu37  | 501 | SNFAWTGATKYHLNGRDSLVPNGVAMATHKDDEERFFPSSGVLMTFGKQAGAGRDNDYSSVMLTSEEEIKTTNPVATEQYGVVADNLQQTNTGPIVGNVNS   |  |
| AAVG2 | 601 | QGALPGMVWQNRDVYLQGPFIWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGLKHPPPIILIKNTPVPADPPTTFSQAKLASFITQYSTGQVSVIEIWEWLQKENS KRWNPE |  |
| rh10  | 601 | QGALPGMVWQNRDVYLQGPFIWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGLKHPPPIILIKNTPVPADPPTTFSQAKLASFITQYSTGQVSVIEIWEWLQKENS KRWNPE |  |
| hu37  | 601 | QGALPGMVWQNRDVYLQGPFIWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGLKHPPPIILIKNTPVPADPPTTFSQAKLASFITQYSTGQVSVIEIWEWLQKENS KRWNPE |  |
| AAVG2 | 701 | IQYTSNYYKSTNVDFAVNTEGTYSEPRPIGTRYLTRNL                                                                  |  |
| rh10  | 701 | IQYTSNYYKSTNVDFAVNTEGTYSEPRPIGTRYLTRNL                                                                  |  |
| hu37  | 701 | IQYTSNYYKSTNVDFAVNTEGTYSEPRPIGTRYLTRNL                                                                  |  |

## Фиг. 14В (AAVrh10)

|            |     |                                                                                                       |
|------------|-----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Начало vp1 |     |                                                                                                       |
| AAVG2      | 1   | atggctgctgacggttatcttccagattggctcgaggacaacctctctgagggcattcgcgagtggtgggacctgaaacctggagcccccaagcccaagg  |
| AAVhu37    | 1   | atggctgctgacggttatcttccagattggctcgaggacaacctctctgagggcattcgcgagtggtgggacctgaaacctggagcccccaagcccaagg  |
| AAVrh10    | 1   | atggctgctgacggttatcttccagattggctcgaggacaacctctctgagggcattcgcgagtggtgggacctgaaacctggagccccgaacccaaaag  |
|            |     |                                                                                                       |
| AAVG2      | 101 | ccaaccagcagaagcaggacgacggccggggtctggtgcttctggctacaagtacctcggaaccttcaacggactcgacaagggggagcccgtaacga    |
| AAVhu37    | 101 | ccaaccagcagaagcaggacgacggccggggtctggtgcttctggctacaagtacctcggaaccttcaacggactcgacaagggggagcccgtaacgc    |
| AAVrh10    | 101 | ccaaccagcaaaagcaggacgacggccggggtctggtgcttctggctacaagtacctcggaaccttcaacggactcgacaagggggagcccgtaacgc    |
|            |     |                                                                                                       |
| AAVG2      | 201 | ggcggacgcgcggccctcgagcacgacaaggcctacgaccagcagctcaaagcgggtgacaatccgtacctgcggtataaccacgcgcgcgcgagttt    |
| AAVhu37    | 201 | ggcggacgcgcggccctcgagcacgacaaggcctacgaccagcagctcaaagcgggtgacaatccgtacctgcggtataaccacgcgcgcgcgagttt    |
| AAVrh10    | 201 | ggcggacgcgcggccctcgagcacgacaaggcctacgaccagcagctcaaagcgggtgacaatccgtacctgcggtataaccacgcgcgcgcgagttt    |
|            |     |                                                                                                       |
| AAVG2      | 301 | caggagcgtctgcaagaagatacgtcttttgggggcaacctcgggcgagcagctttccaggccaagaagcgggttctcgaaacctctcggtctggttgagg |
| AAVhu37    | 301 | caggagcgtctgcaagaagatacgtcttttgggggcaacctcgggcgagcagctttccaggccaagaagcgggttctcgaaacctctcggtctggttgagg |
| AAVrh10    | 301 | caggagcgtctgcaagaagatacgtcttttgggggcaacctcgggcgagcagctttccaggccaagaagcgggttctcgaaacctctcggtctggttgagg |
| Начало vp2 |     |                                                                                                       |
| AAVG2      | 401 | aagctgctaagacggctcctggaaagaagagaccggtagaacctgacacctcagcgatccccgactcctccacgggcatcggcaaaaaggccagcagcc   |
| AAVhu37    | 401 | aagctgctaagacggctcctggaaagaagagaccggtagaacctgacacctcagcggttccccgactcctccacgggcatcggcaagaaggccagcagcc  |
| AAVrh10    | 401 | aagcgctaagacggctcctggaaagaagagaccggtagagccatcacccagcggttctccagactcctctacgggcatcggcaagaaggccagcagcc    |
|            |     |                                                                                                       |
| AAVG2      | 501 | cgcgagaaagagactgaactttgggcagactggcgactcagagtcagtcctccgacctcaaccaatcggagaaccaccagcaggccctctggtctggga   |
| AAVhu37    | 501 | cgcgaaaaagagactgaactttggtcagactggcgactcagagtcagtcctccgacctcaaccaatcggagaaccaccagcaggccctctggtctggga   |
| AAVrh10    | 501 | cgcgaaaaagagactcaactttgggcagactggcgactcagagtcagtcgcccgaacctcaaccaatcggagaaccccccgaggccctctggtctggga   |
| Начало vp3 |     |                                                                                                       |
| AAVG2      | 601 | tctggtacaatggctgcaggcgggtggcgctccaatggcagacaataacgaaggcgccgacggagtggtagtttctcaggaaattggcattgcgattcca  |
| AAVhu37    | 601 | tctggtacaatggctgcaggcgggtggcgctccaatggcagacaataacgaaggcgccgacggagtggtagtttctcaggaaattggcattgcgattcca  |
| AAVrh10    | 601 | tctggtacaatggctgcaggcgggtggcgctccaatggcagacaataacgaaggcgccgacggagtggtagtttctcaggaaattggcattgcgattcca  |
|            |     |                                                                                                       |
| AAVG2      | 701 | catggctggggcagacagagtcacaccaccagcaccgaacctggggcctgcccacctacaacaaccacctctacaagcaaatctccaatgggacatcggg  |
| AAVhu37    | 701 | catggctggggcagacagagtcacaccaccagcaccgaacctggggcctgcccacctacaacaaccacctctacaagcaaatatccaatgggacatcggg  |
| AAVrh10    | 701 | catggctggggcagacagagtcacaccaccagcaccgaacctggggcctccccacctacaacaaccacctctacaagcaaatctccaacgggacttcggg  |

## Фиг. 14С (AAVrh10)

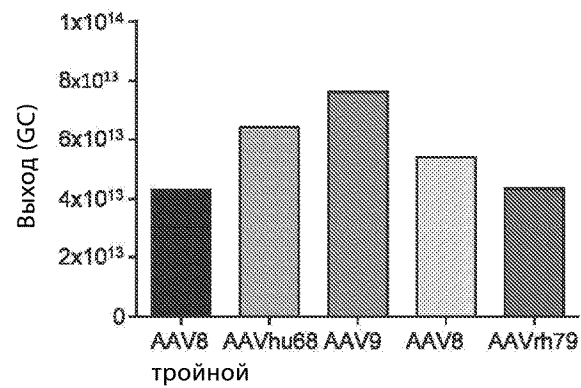
|         |      |                                                                                                        |
|---------|------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| AAVG2   | 801  | aggaagcaccacgacaacacctaacttcgggtacagcacccttggggtatcttgacttcaacagattccactgtcacttctcaccacgtgactggcag     |
| AAVhu37 | 801  | aggaagcaccacgacaacacctaacttcgggtacagcacccttggggtatcttgacttcaacagattccactgtcacttctcaccacgtgactggcag     |
| AAVrh10 | 801  | aggaagcaccacgacaacacctaacttcgggtacagcacccttggggtatcttgacttcaacagattccactgtcacttctcaccacgtgactggcag     |
| AAVG2   | 901  | agactcatcaacaacaactggggattccggcccaagagactcagcttcaagctcttcaacatccagggttaaggaggtcacgcagaatgaaggcaccaaga  |
| AAVhu37 | 901  | cgactcatcaacaacaactggggattccggcccaaaagactcagcttcaagctcttcaacatccagggtcaaggaggtcacgcagaatgaaggcaccaaga  |
| AAVrh10 | 901  | cgactcatcaacaacaactggggattccggcccaagagactcaacttcaagctcttcaacatccagggtcaaggaggtcacgcagaatgaaggcaccaaga  |
| AAVG2   | 1001 | ccatcgccaataaccttaccagcacgattcagggtatttacggactcggaataaccagctgccgtacgtcctcggtccgcgcaccagggctgcctgcctcc  |
| AAVhu37 | 1001 | ccatcgccaataaccttaccagcacgattcagggtatttacggactcggaataaccagctgccgtacgtcctcggtccgcgcaccagggctgcctgcctcc  |
| AAVrh10 | 1001 | ccatcgccaataaccttaccagcacgattcagggtatttacggactcggaataaccagctccccgtacgtcctcggtccgcgcaccagggctgcctgcctcc |
| AAVG2   | 1101 | gttcccgccggatgtcttcatgattcccagtcagggtacctgacactgaacaacggaagtcaagccgtaggccgttctcattctactgctggaatat      |
| AAVhu37 | 1101 | gttcccgccggacgtcttcatgattcccagtcagggtacctgacactgaacaatggaagtcaagccgtaggccgttctcattctactgctggaatat      |
| AAVrh10 | 1101 | gttcccgccggacgtcttcatgattcccagtcagggtacctgacactgaacaatggcagtcaggccgtgggcccgttctcattctactgctggaagtac    |
| AAVG2   | 1201 | tttccatctcaaatgctgcggaactggaacaactttgaatttagctacacctttgaggacgtgccttccacagcagctacgcacacagccagagcctgg    |
| AAVhu37 | 1201 | tttccatctcaaatgctgcggaactggaacaactttgaatttagctacaccttcgaggacgtgccttccacagcagctacgcacacagccagagcctgg    |
| AAVrh10 | 1201 | tttccatctcaaatgctgagaaacgggcaacaactttgagttcagctaccagtttgaggacgtgcctttccacagcagctacgcgcacagccaaagcctgg  |
| AAVG2   | 1301 | accggctgatgaacctctcatcgaccagtagctgtattacctatccagaactcagtcacaggaggaaactcaagggtacacagcaattgttattttctca   |
| AAVhu37 | 1301 | accgactgatgaatcctctcatcgaccagtagctgtactacttaccagaactcagtcacaggaggaaactcaagggtacccagcaattgttattttctca   |
| AAVrh10 | 1301 | accggctgatgaacccccctcatcgaccagtagctgtactacctgtctcgactcagtcacgggaggtaaccgcaggaactcagcagttgctattttctca   |
| AAVG2   | 1401 | agccgggctgcgaatatgtcggtcagggccaagaactgggtacctggaccttgctaccggcagcagcagtagtctccacgacactgtcgaaaacaacaac   |
| AAVhu37 | 1401 | agctgggctgcgaacatgtcggtcagggcctaagaactgggtacctggaccttgctaccggcagcagcagtagtctctacgacactgtcgaaaacaacaac  |
| AAVrh10 | 1401 | ggccgggctcaataacatgtcggtcagggccaagaactgggtacccgggcccctgctaccggcagcaacgcgtctccacgacactgtcgaaaataacaac   |
| AAVG2   | 1501 | agcaacttttgcttgactgggtgccacgaatatcatctgaacggaagagactcttgggtgaatcccggtgttgctatggcaacgcataaggacgacgagg   |
| AAVhu37 | 1501 | agcaacttttgcttgactgggtgccacgaatatcactgaacggaagagactcttgggtgaatcccggtgtcgccatggcaaccacaaggacgacgagg     |
| AAVrh10 | 1501 | agcaacttttgcttgactgggtgccaccaagtatcatctgaatggcagagactctctgggtgaatcccggtgtcgctatggcaaccacaaggacgacgaag  |

## Фиг. 14D (AAVrh10)

|         |      |                                                                                                        |
|---------|------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| AAVG2   | 1601 | aacgtttctttccatcgagcggagtcctgatgtttggaaaacaggggtgctggaagagacaatgtggactatagcagcgttatgctaaccagcgaggaaga  |
| AAVhu37 | 1601 | aacgcttcttcccgtcgagtgaggctcctgatgttcggaaaacaggggtgctggaagagacaatgtggactacagcagcgttatgctaaccagcgaagaaga |
| AAVrh10 | 1601 | agcgatTTTTTccgtccagcggagtcctaatgtttggaaaacagggagctggaaaagacaacgtggactatagcagcgttatgctaaccagtgaggaaga   |
| AAVG2   | 1701 | aatcaagaccactaaccctgtagccactgaacaatacggcggtggtggctgataacttgagcaaaaccaatacaggacctatcgtgggaaatgtcaacagc  |
| AAVhu37 | 1701 | aattaaaaccactaaccctgtagccacagaaacaatacgggtggtggctgacaacttgagcaaaaccaatacagggcctattgtgggaaatgtcaacagc   |
| AAVrh10 | 1701 | aattaaaaccaccaaccagtggtccacagaaacagtagggcggtggtggcgataacctgcaacagcaaaacgcccgtcctattgtaggggcccgtcaacagt |
| AAVG2   | 1801 | caaggagccttacctggcatggtctggcagaaccgagacgtgtacctgcaggggtcccatctgggccaagattcctcacacggacggcaactttcacccgt  |
| AAVhu37 | 1801 | caaggagccttacctggcatggtctggcagaaccgagacgtgtacctgcaggggtcccatctgggccaagattcctcacacggacggcaactttcacccctt |
| AAVrh10 | 1801 | caaggagccttacctggcatggtctggcagaaccgggacgtgtacctgcaggggtcctatctgggccaagattcctcacacggacgggaaactttcatccct |
| AAVG2   | 1901 | ctctctgatgggagggtttggactgaaacacccgcctcctcaaactcctgatcaagaacactcccgttcctgcggatcctccaacgacgttcagccaggc   |
| AAVhu37 | 1901 | caccgctaattgggaggatttggactgaagcaccacctcctcagatcctgatcaagaacacgccggtagcctgcggatcctccaacacgttcagccaggc   |
| AAVrh10 | 1901 | cgcgctgatgggagggtttggactgaaacacccgcctcctcagatcctgattaagaatacacctgttcccgcggatcctccaactaccttcagtcaagc    |
| AAVG2   | 2001 | gaaattggcttccttcattacgcagtagcaccggacaggtcagcgtgggaatcgagtgaggagctgcagaaggagaaacagcaacgctggaaccagaa     |
| AAVhu37 | 2001 | gaaattggcttccttcattacgcagtagcaccggacaggtcagcgtgggaatcgagtgaggagctgcagaaggagaaacagcaacgctggaaccagag     |
| AAVrh10 | 2001 | taagctggcgctcgttcattacgcagtagcaccggacaggtcagcgtgggaattgaatgggagctgcagaagaaaaacagcaaacgctggaaccagag     |
| AAVG2   | 2101 | attcagtatacttccaactactacaaatctacaaatgtggactttgctgtcaataaccaggggtacatatcagagcctcgccccattggaactcgttacc   |
| AAVhu37 | 2101 | attcagtacacttcaaactactacaaatctacaaatgtggactttgctgtcaatacagagggaacttattctgagcctcgccccattggtactcgttacc   |
| AAVrh10 | 2101 | attcaatacacttccaactactacaaatctacaaatgtggactttgctgttaacacagatggcacttattctgagcctcgccccattggcacccttacc    |
| AAVG2   | 2201 | tcacccgtaatctg                                                                                         |
| AAVhu37 | 2201 | tcacccgtaatctg                                                                                         |
| AAVrh10 | 2201 | tcacccgtaatctg                                                                                         |

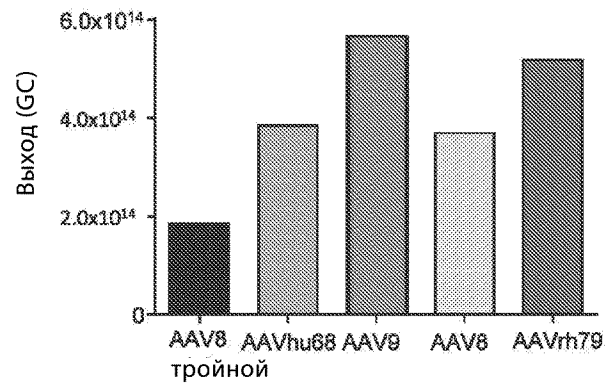
Фиг. 15А

Выход маломасштабных препаратов  
(CMV.ffLuciferase.SV40)

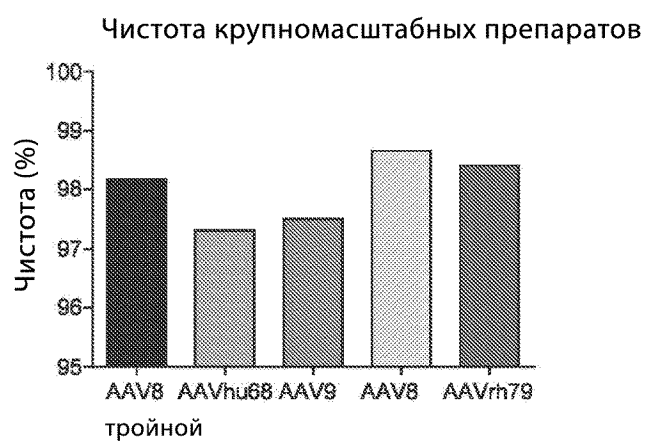


Фиг. 15В

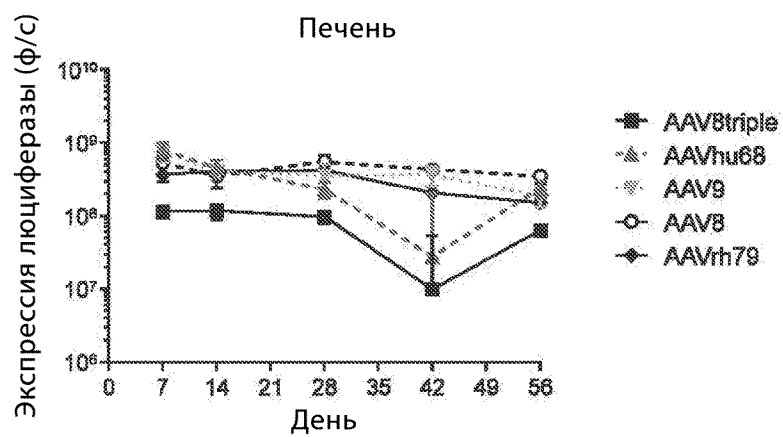
Выход крупномасштабных препаратов  
(CMV.PI.201lg IA.SV40)



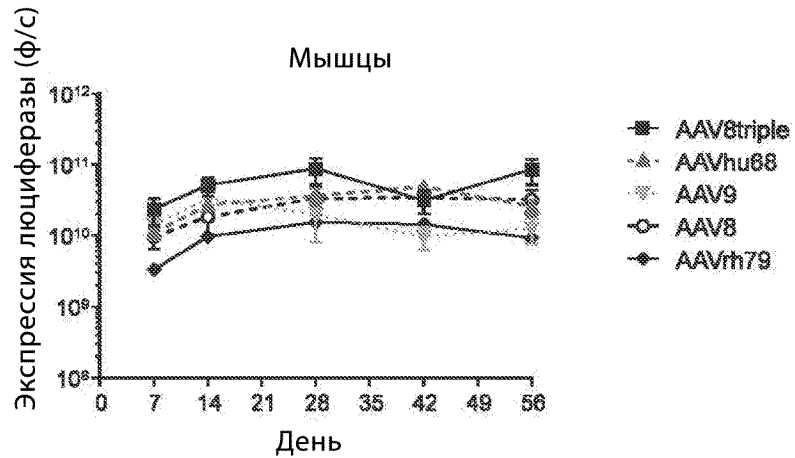
Фиг. 16



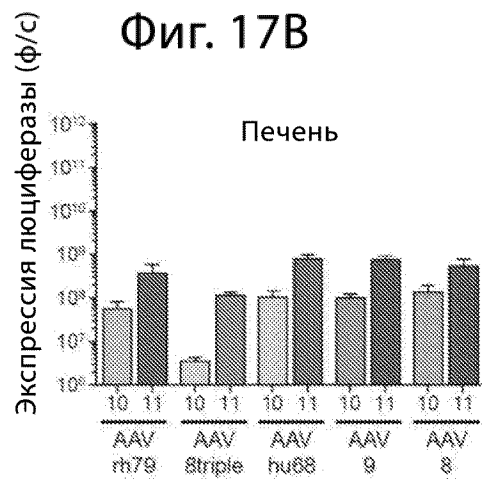
Фиг. 17А



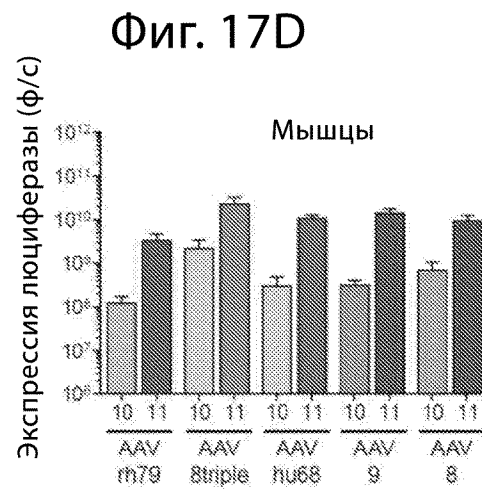
Фиг. 17В



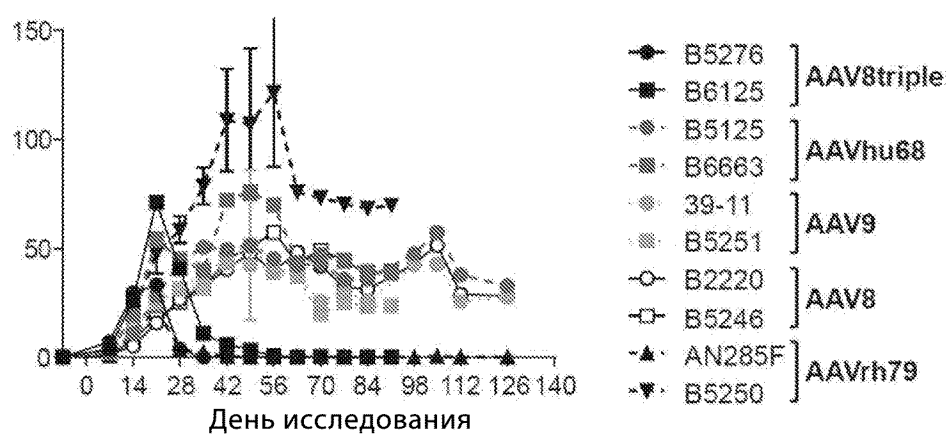
Фиг. 17В



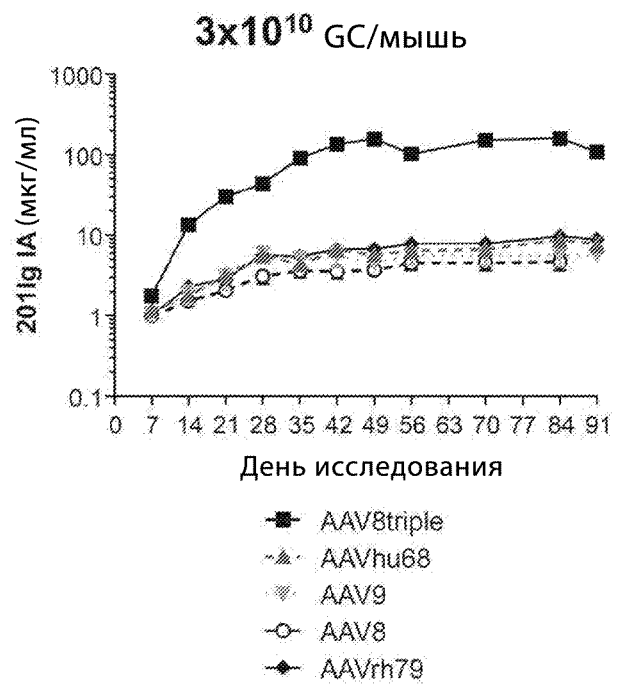
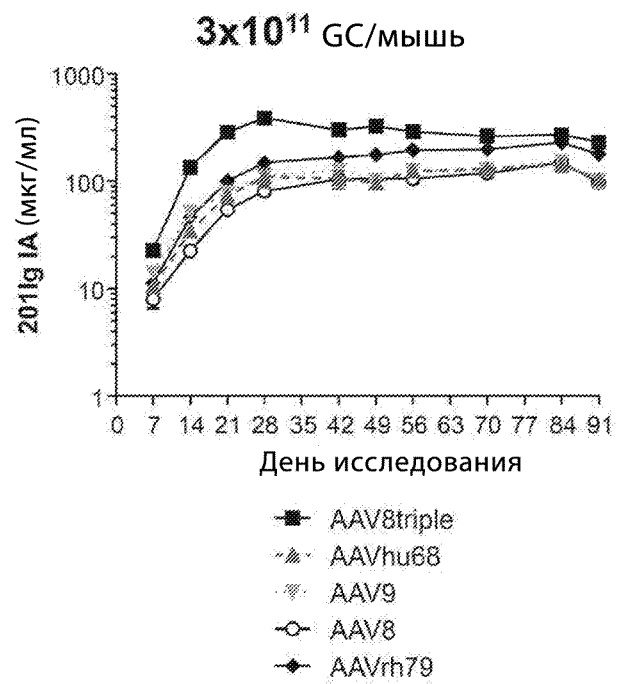
Фиг. 17D

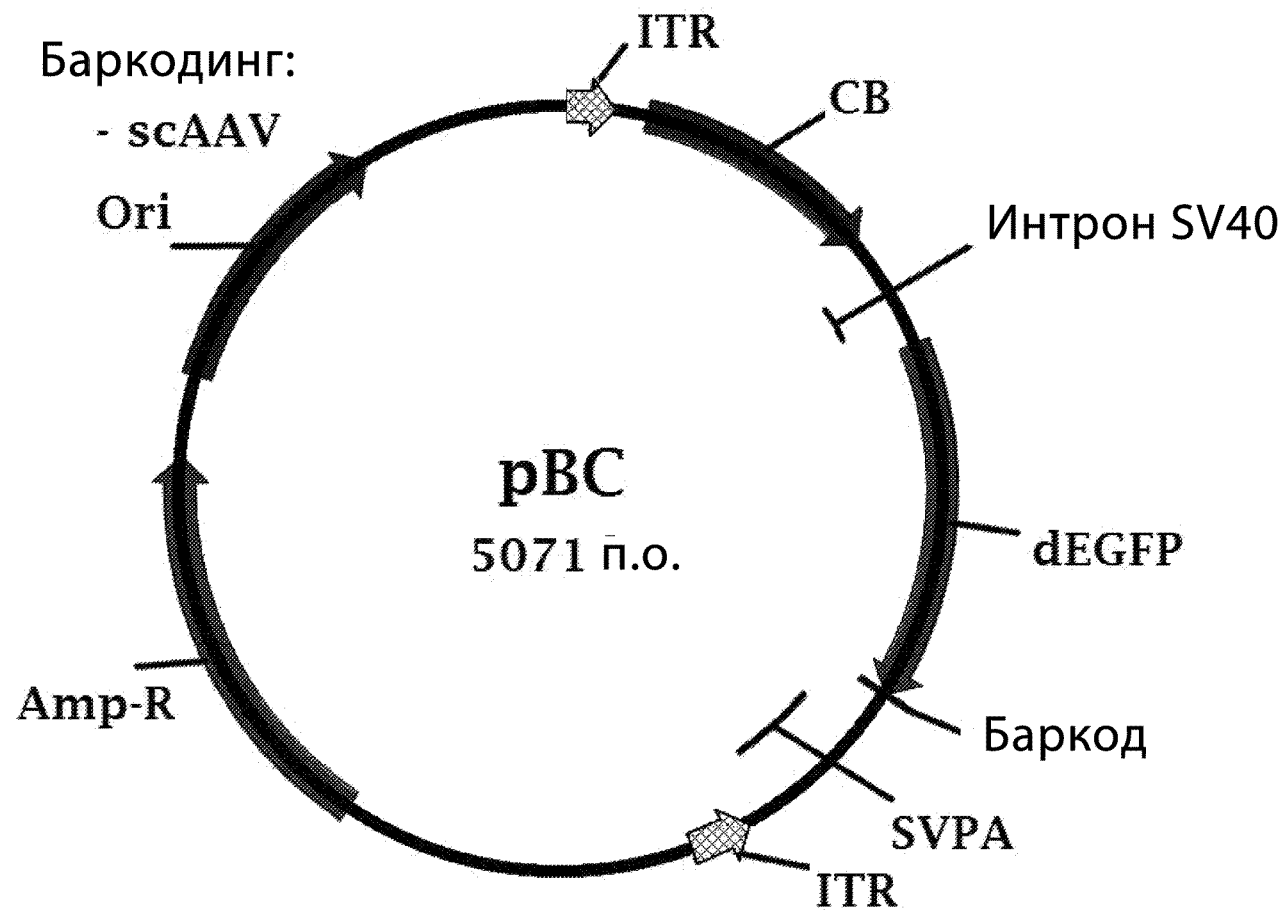


Фиг. 17Е



Фиг. 17F





Фиг. 18А

- In vivo тестирование, В6 мыши
- AAV8.AR2.08, 2e12 гс/мышь, 2 недели, внутривенно

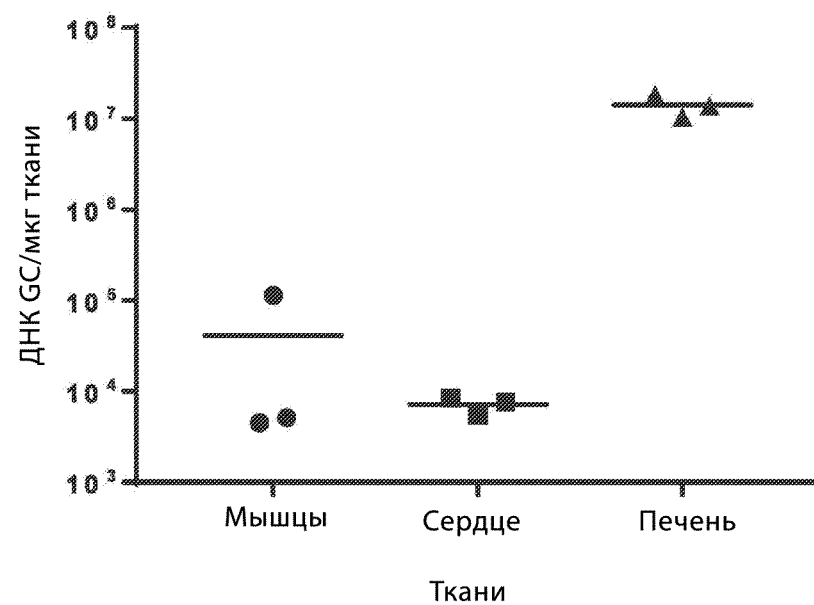
| Код                            | Количество на мышь (ГС) |
|--------------------------------|-------------------------|
| BC01                           | 6.87E+09                |
| BC02                           | 1.04E+10                |
| BC03                           | 1.59E+10                |
| BC04                           | 2.41E+10                |
| BC05                           | 3.67E+10                |
| BC06                           | 5.57E+10                |
| BC07                           | 8.47E+10                |
| BC08                           | 1.29E+11                |
| BC09                           | 1.96E+11                |
| BC10                           | 2.97E+11                |
| BC11                           | 4.52E+11                |
| BC12                           | 6.87E+11                |
| Общее количество<br>гс в смеси | <b>2.00E+12</b>         |

Фиг. 18В

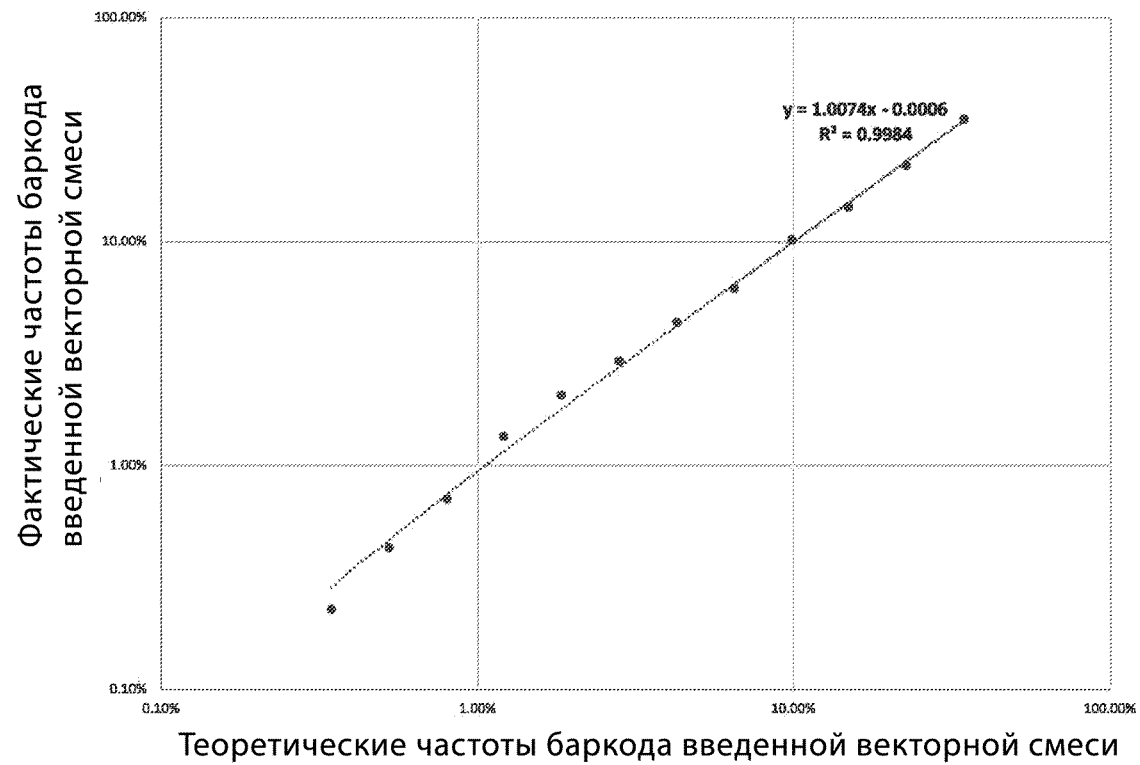
Фиг. 18С

- Распределение геномной ДНК вектора

Биораспределение вектора

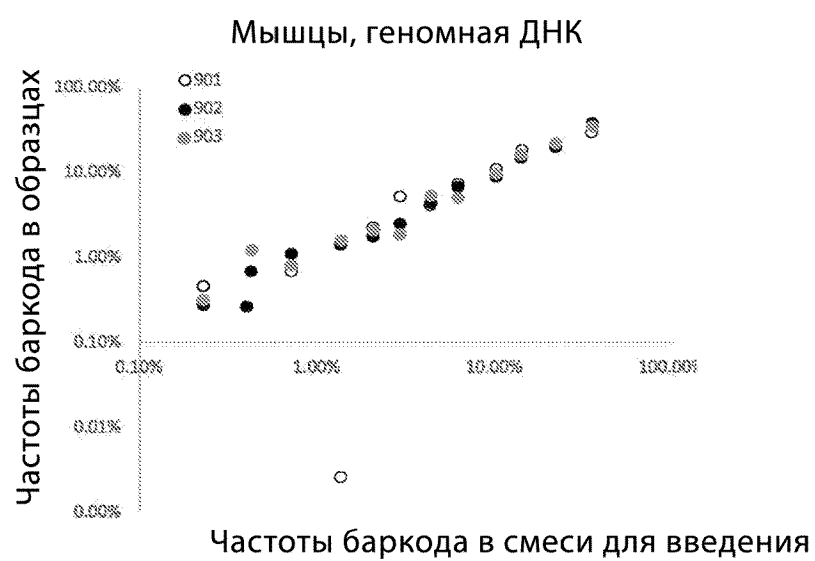


Фиг. 18D

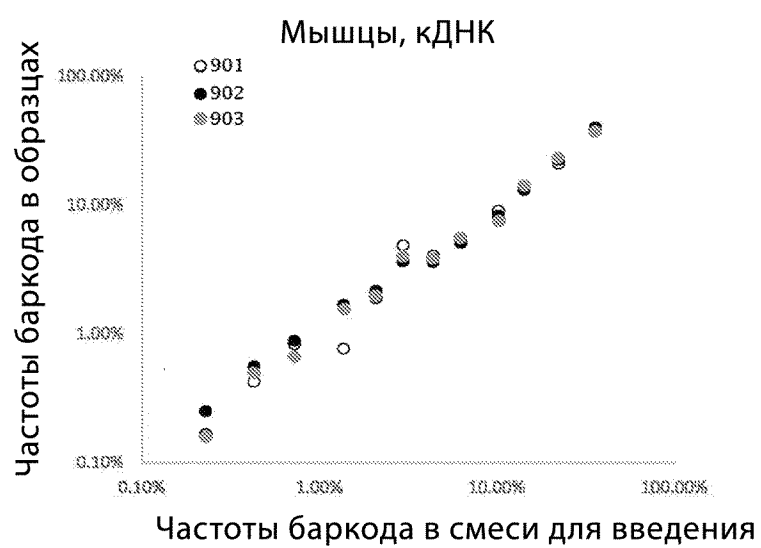


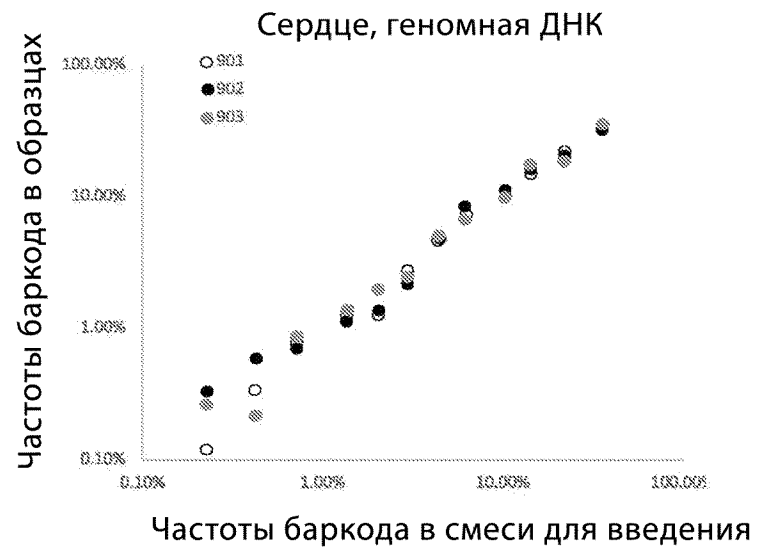
Фиг. 18D

Фиг. 19А

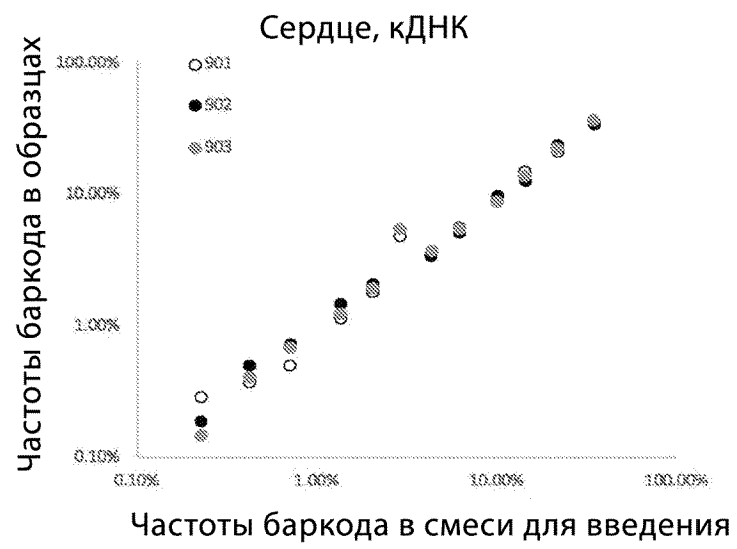


Фиг. 19В



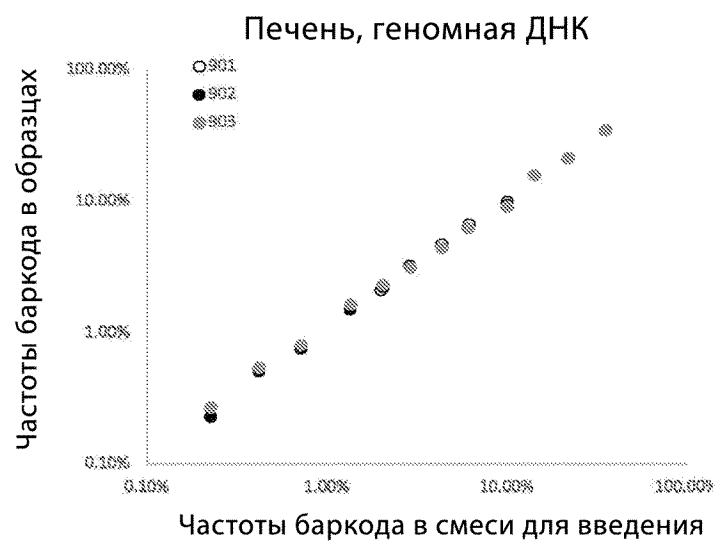


Фиг. 19С

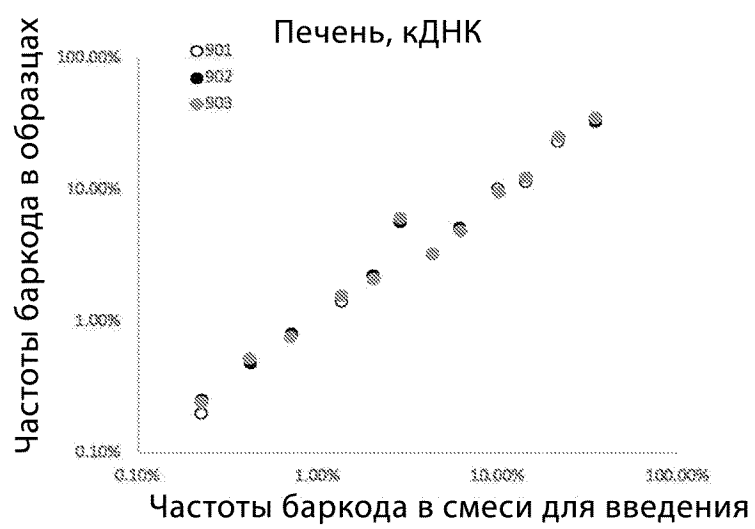


Фиг. 19D

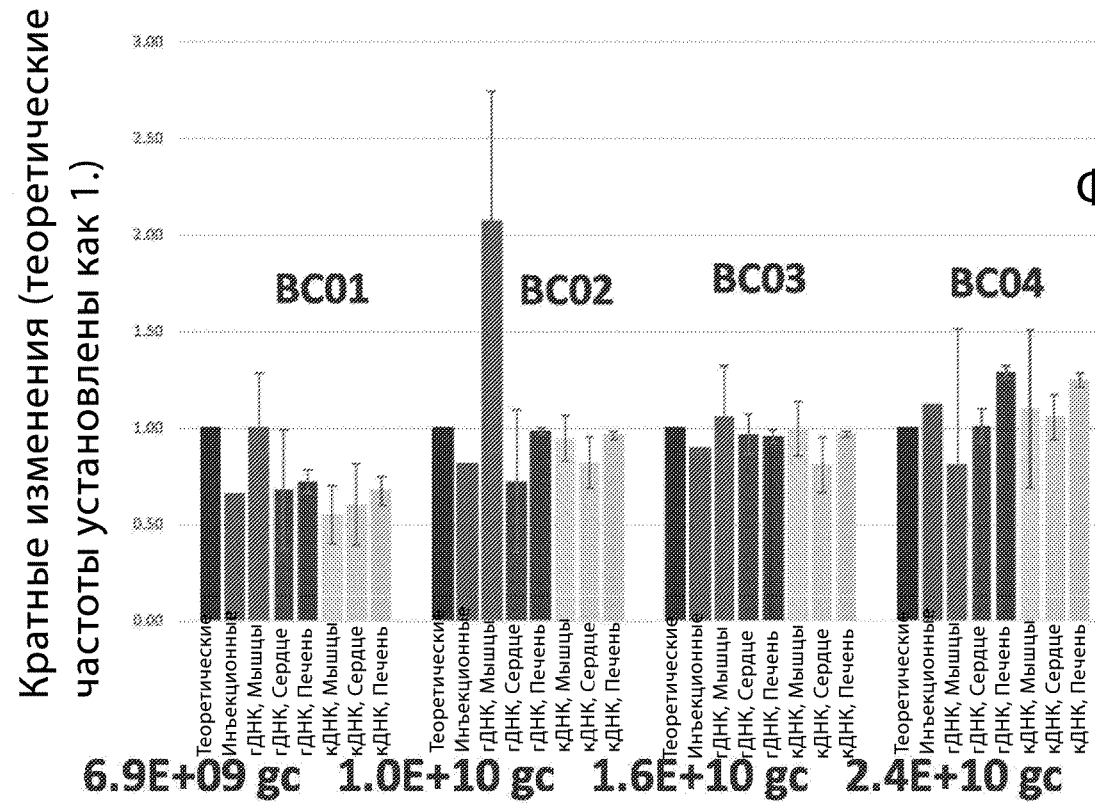
Фиг. 19Е



Фиг. 19F

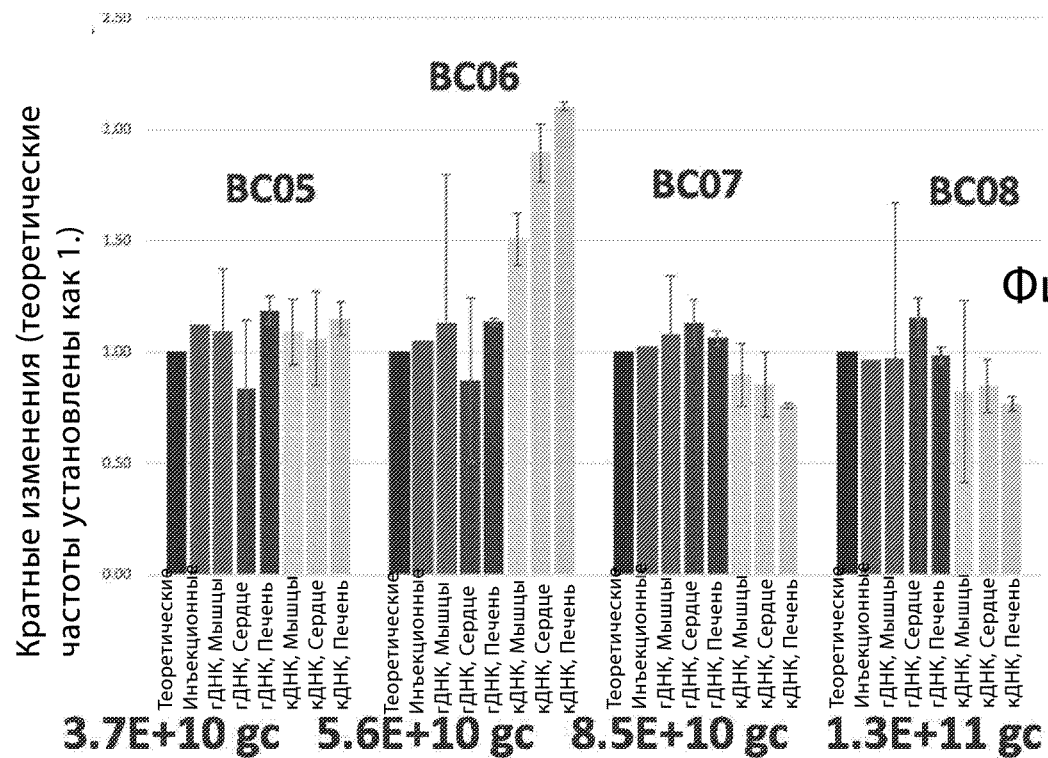


Кратные изменения (по сравнению с теоретическими частотами)



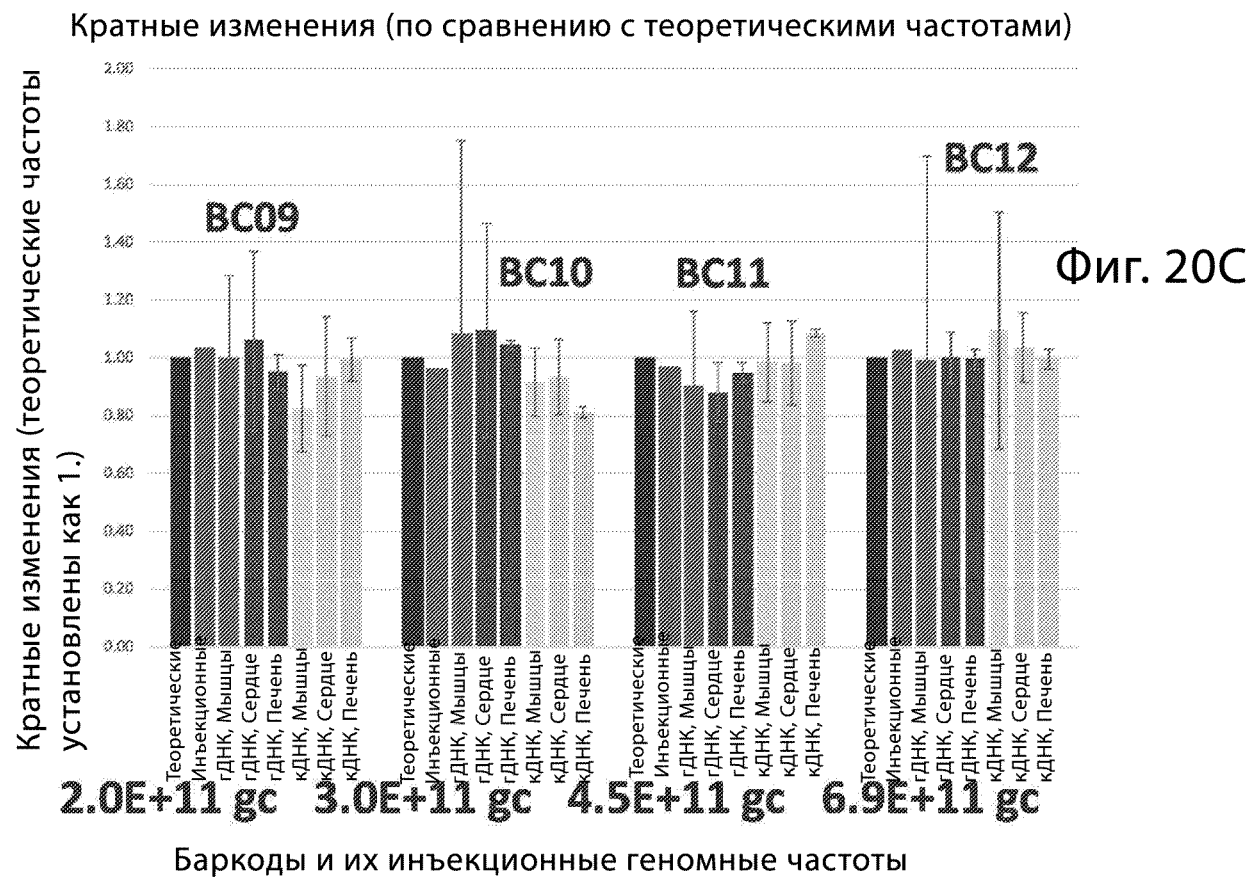
Баркоды и их инъекционные геномные частоты

Кратные изменения (по сравнению с теоретическими частотами)

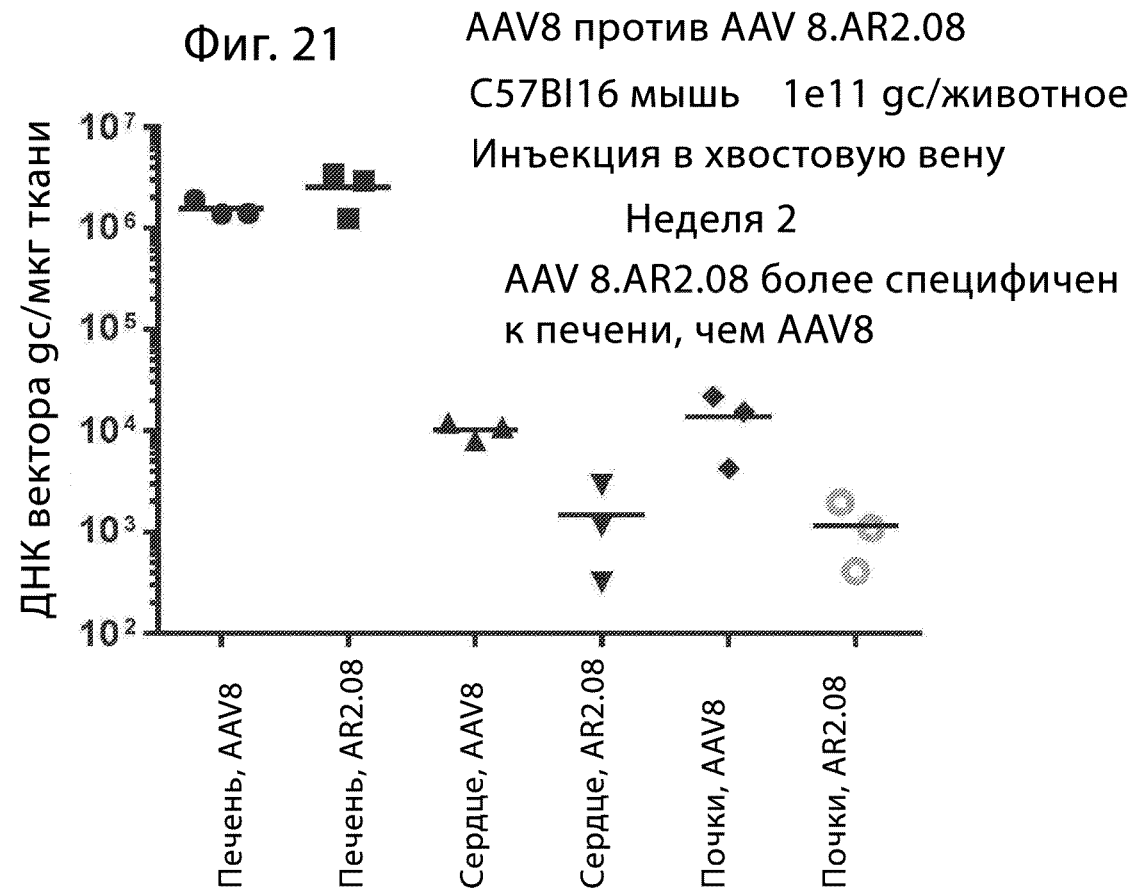


Фиг. 20В

Баркоды и их инъекционные геномные частоты



## Биораспределение у мышей



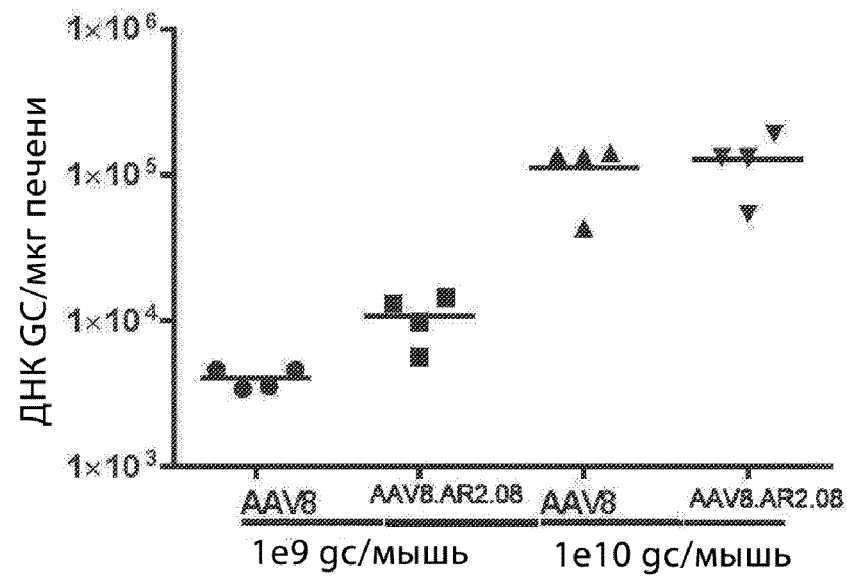
Фиг. 22

\* AAV8 против AAV8.AR2.08

— CB7.Cl.eGFP.W  
PRE.rBG

— 1e9 и 1e10  
гс/животное

— B6, самец, внутривенно,  
печень недели 2



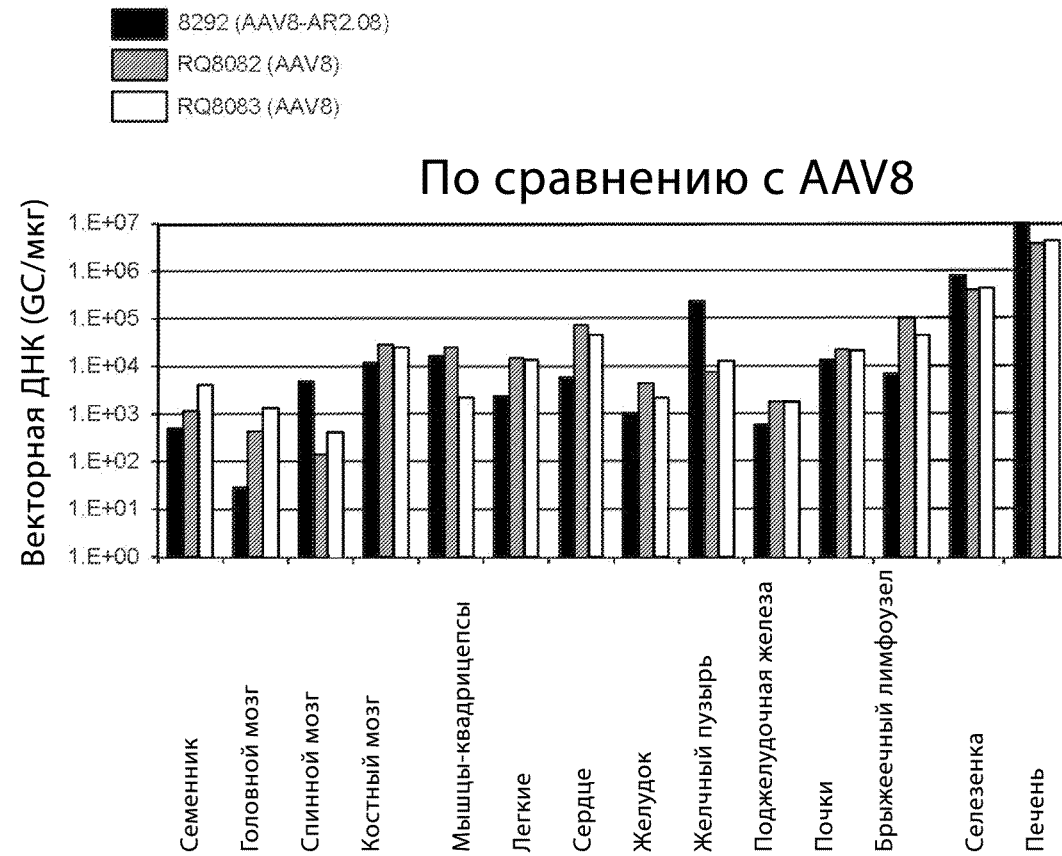
Обработки

Фиг. 23

| Номер партии | Название вектора                          | Геномный титр по ddPCR-GC/мл | Общий выход ddPCR | Чистота |
|--------------|-------------------------------------------|------------------------------|-------------------|---------|
| WL184CS      | AAVG3.TBG.PI.eGFP.WPRE.bGH(p0080:p0146)   | 1.141e14 GC/мл               | 6.104e14 GC       | 100.000 |
| WL1549CS     | AAV8.TBG.PI.eGFP.WPRE.bGH                 | 1.11e14                      | 5.578e14          | 98.9    |
| WL1956CS     | AAVrh79.TBG.PI.eGFP.WPRE.bGH(p3889:p0146) | 1.609e14                     | 8.568e14          |         |

Фиг. 24

## Биораспределение вектора AAV8.AR2.08 (17-07)



Фиг. 25

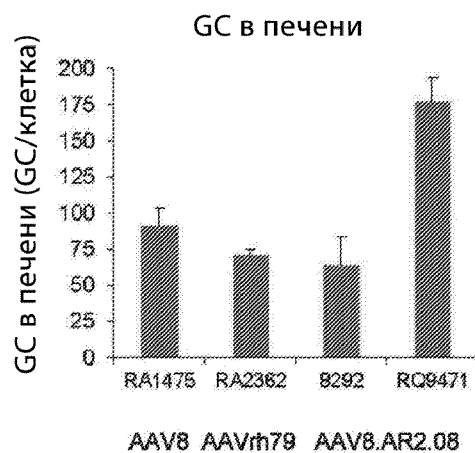
17-07: Трансдукция печени новым серотипом

( $1 \times 10^{13}$  ddGC/кг), вскрытие на 7 день

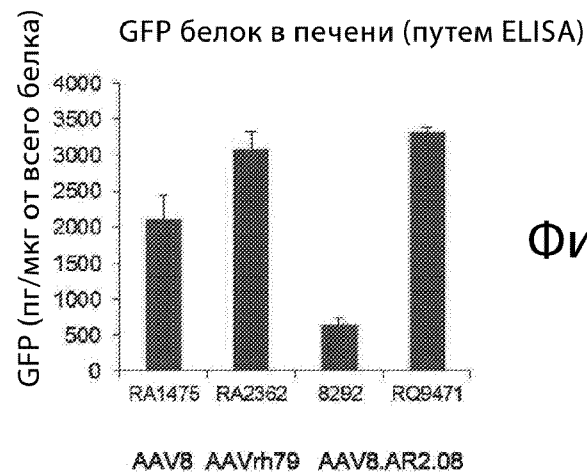
| Серотип     | ID     | Виды         | Пол | Вес (кг) |
|-------------|--------|--------------|-----|----------|
| AAV8        | RA1475 | Макака-резус | Ж   | 4.60     |
| AAVrh79     | RA2362 | Яванская     | Ж   | 4.10     |
| AAV8.AR2.08 | 8292   | Яванская     | М   | 8.55     |
| AAV8.AR2.08 | RQ9471 | Макака-резус | Ж   | 9.26     |

## 17-07: Трансдукция печени новыми серотипами

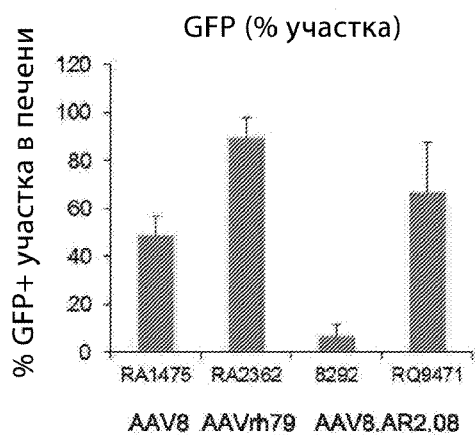
Фиг. 26А



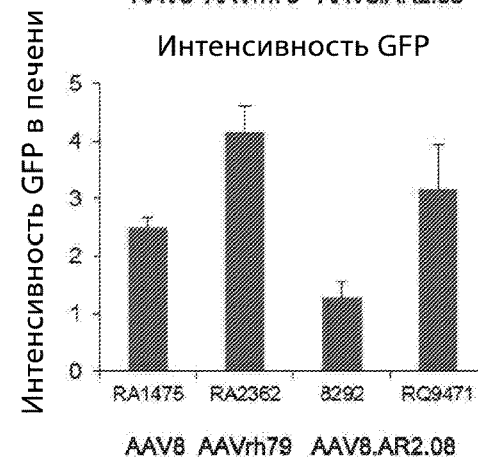
Фиг. 26В



Фиг. 26С

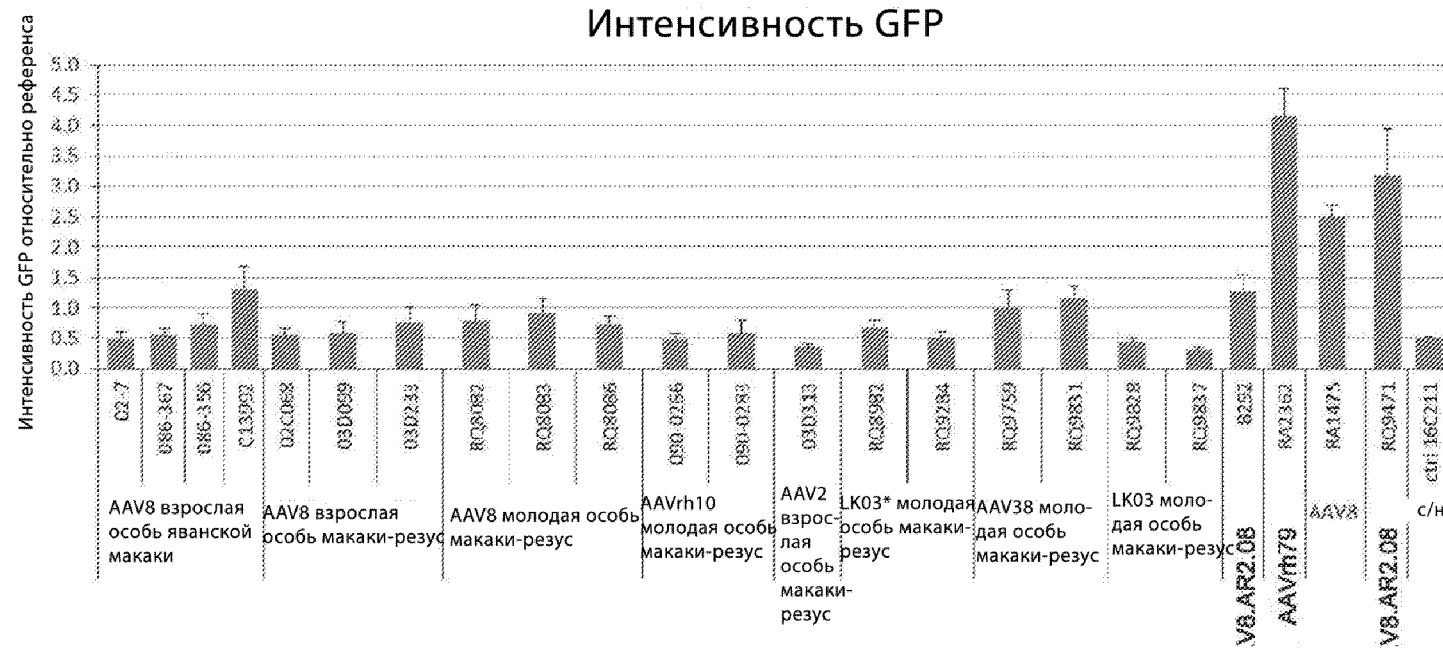


Фиг. 26D

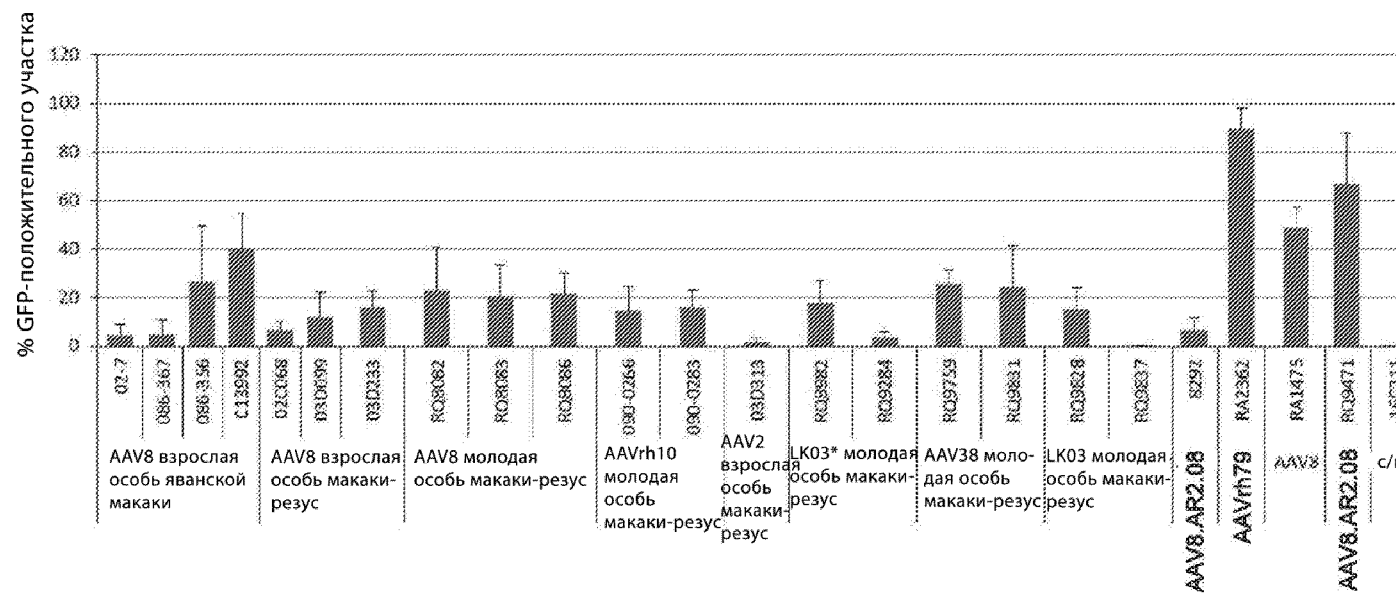


Фиг. 27А

# Экспрессия GFP в печени NHP



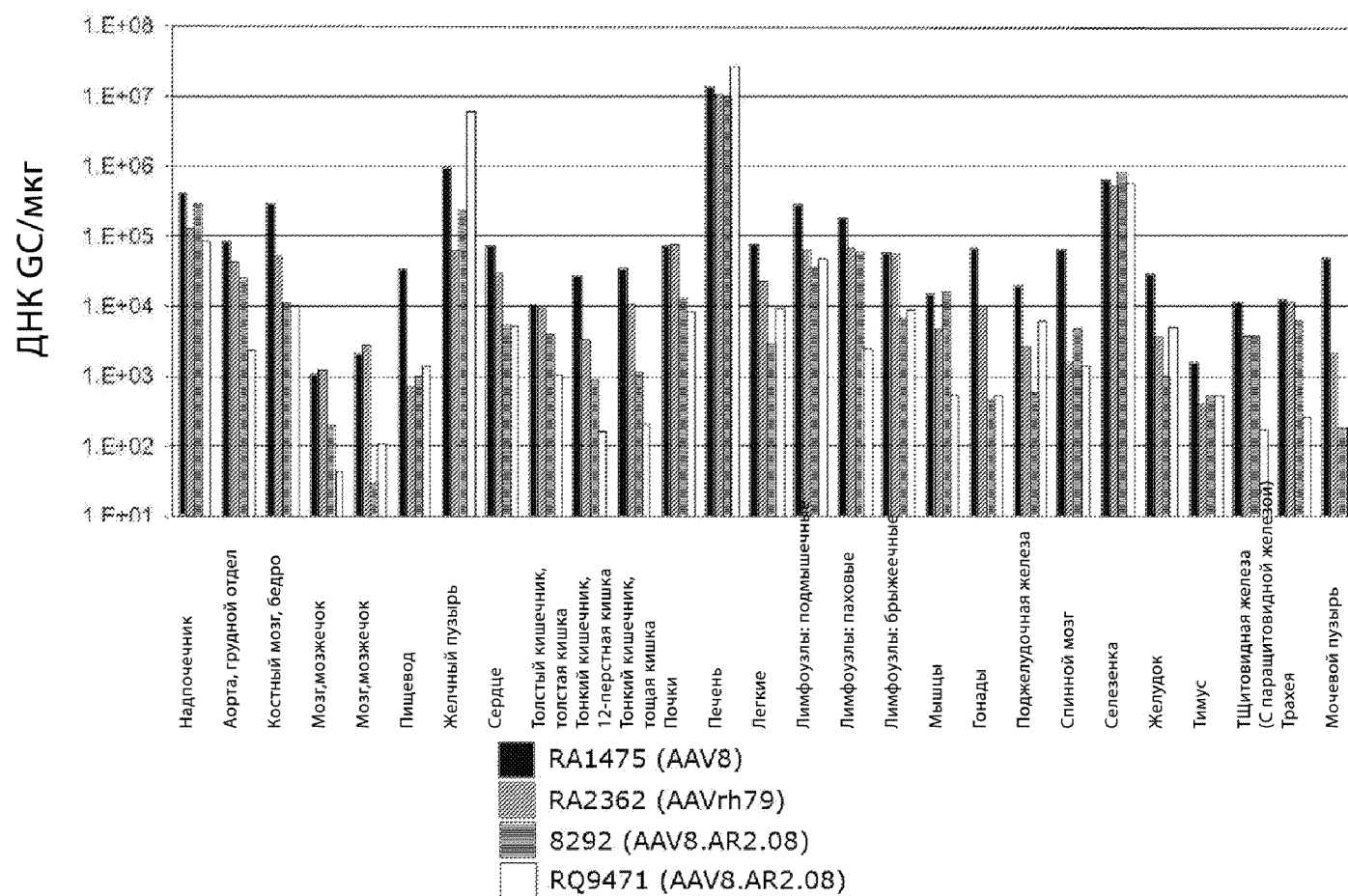
## Экспрессия GFP в печени NHP GFP+ участок (печень)



Фиг. 27В

Фиг. 28

# 17-07: Биораспределение вектора



Фиг. 29

# 17-07с Биораспределение RA2362

