



## **КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ МАКУЛЯРНОЙ ДИСТРОФИИ**

### **ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ**

**[01]** Настоящая заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке на патент USSN 62/653131, поданной 5 апреля 2018 г., содержание которой полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

### **ВКЛЮЧЕНИЕ СПИСКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ**

**[02]** Содержимое текстового файла с именем «NIGH-011/002WO\_SeqList.txt», который был создан 4 апреля 2019 г. и имеет размер 72 КБ, настоящим полностью включено в данное описание посредством ссылки.

### **ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ**

**[03]** Настоящее изобретение относится к области молекулярной биологии, нейробиологии и генной терапии для лечения дегенеративных заболеваний глаз.

### **УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ**

**[04]** Макулярная дегенерация представляет собой заболевание, которое может привести к нечеткости или отсутствию зрения в центре поля зрения. При макулярной дегенерации фоторецепторы в части сетчатки, называемой желтым пятном, которая отвечает за центральное зрение, вырождаются или отмирают. В некоторых случаях макулярная дегенерация вызвана мутациями в гене Бестрофин-1 (BEST1, также называемый VMD2). В настоящее время не существует лечения данного тяжелого заболевания. Таким образом, в данной области техники давно существует потребность в дополнительных терапевтических подходах для лечения макулярной дегенерации. В настоящем описании предложены композиции и способы лечения макулярной дегенерации.

### **СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

**[05]** В данном изобретении предложена композиция, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую: (a) последовательность, кодирующую промотор вителиформной макулярной дистрофии-2 (VMD2), и (b) последовательность, кодирующую белок Бестрофин-1 (BEST1). В некоторых вариантах осуществления, последовательность, кодирующая промотор VMD2, кодирует промотор VMD2 человека. В некоторых вариантах осуществления, последовательность, кодирующая белок BEST1, кодирует белок BEST1 человека. В некоторых вариантах осуществления, последовательность, кодирующая белок BEST1, содержит кодирующую последовательность. В некоторых вариантах осуществления, последовательность, кодирующая белок BEST1, содержит последовательность кДНК.

**[06]** В данном изобретении предложена композиция, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую: (a) последовательность, кодирующую убиквитарный промотор, и (b) последовательность, кодирующую белок Бестрофин-1 (BEST1). В некоторых вариантах осуществления, последовательность, кодирующая белок BEST1, кодирует белок BEST1 человека. В некоторых вариантах осуществления, последовательность, кодирующая белок BEST1, содержит кодирующую последовательность. В некоторых вариантах осуществления, последовательность, кодирующая белок

BEST1, содержит последовательность кДНК. В некоторых вариантах осуществления, последовательность, кодирующая убиквитарный промотор, содержит последовательность, кодирующую промотор CAG.

**[07]** В некоторых вариантах осуществления композиций согласно настоящему описанию, последовательность нуклеиновой кислоты дополнительно содержит: (с) последовательность, кодирующую посттранскрипционный регуляторный элемент (PRE). В некоторых вариантах осуществления, последовательность, кодирующая PRE, содержит последовательность, выделенную или полученную из встречающейся в природе последовательности. В некоторых вариантах осуществления, последовательность, кодирующая PRE, содержит последовательность, выделенную или полученную из не встречающейся в природе последовательности. В некоторых вариантах осуществления, последовательность, кодирующая PRE, содержит последовательность, выделенную или полученную из последовательности вирусного генома. В некоторых вариантах осуществления, последовательность, кодирующая PRE, содержит последовательность, выделенную или полученную из вируса гепатита сурков (WPRE).

**[08]** В некоторых вариантах осуществления композиций согласно настоящему описанию, последовательность нуклеиновой кислоты дополнительно содержит: (d) последовательность, кодирующую сигнал полиаденилирования (полиА). В некоторых вариантах осуществления, последовательность, кодирующая сигнал полиА, содержит последовательность, выделенную или полученную из встречающейся в природе последовательности. В некоторых вариантах осуществления, последовательность, кодирующая сигнал полиА, содержит последовательность, выделенную или полученную из не встречающейся в природе последовательности. В некоторых вариантах осуществления, последовательность, кодирующая сигнал полиА, содержит последовательность, выделенную или полученную из последовательности млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления, последовательность, кодирующая сигнал полиА, содержит последовательность, выделенную или полученную из последовательности человека. В некоторых вариантах осуществления, последовательность, кодирующая сигнал полиА, содержит последовательность, выделенную или полученную из гена бычьего гормона роста (BGH).

**[09]** В некоторых вариантах осуществления композиций согласно настоящему описанию, последовательность нуклеиновой кислоты дополнительно содержит: (е) последовательность, кодирующую 5'-нетранслируемую область (UTR). В некоторых вариантах осуществления, последовательность, кодирующая 5' UTR, содержит последовательность, выделенную или полученную из встречающейся в природе последовательности. В некоторых вариантах осуществления, последовательность, кодирующая 5' UTR, содержит последовательность, выделенную или полученную из не встречающейся в природе последовательности. В некоторых вариантах осуществления, последовательность, кодирующая 5' UTR, содержит последовательность, выделенную или полученную из последовательности млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления, последовательность, кодирующая 5' UTR, содержит последовательность, выделенную или полученную из последовательности человека. В некоторых вариантах осуществления, последовательность, кодирующая 5' UTR, содержит последовательность, выделенную или полученную из последовательности вирусного генома.

В некоторых вариантах осуществления композиций согласно настоящему описанию, последовательность нуклеиновой кислоты дополнительно содержит: (f) последовательность, кодирующую интрон, и (g) последовательность, кодирующую экзон, при этом последовательность, кодирующая интрон, и последовательность, кодирующая экзон, являются функционально связанными. В некоторых вариантах осуществления, интрон расположен между последовательностью, кодирующей промотор VMD2, и последовательностью, кодирующей экзон, при этом последовательность, кодирующая экзон, расположена

между последовательностью, кодирующей интрон, и последовательностью, кодирующей 5' UTR, и при этом последовательность, кодирующая интрон, сплайсирована клеткой млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления, последовательность, кодирующая экзон, содержит последовательность, выделенную или полученную из гена млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления, последовательность, кодирующая экзон, содержит последовательность, выделенную или полученную из гена бета-глобина кролика (*Oryctolagus cuniculus*). В некоторых вариантах осуществления, последовательность, кодирующая интрон, содержит не встречающуюся в природе последовательность. В некоторых вариантах осуществления, последовательность, кодирующая интрон, содержит последовательность слияния. В некоторых вариантах осуществления, последовательность, кодирующая интрон, содержит последовательность, кодирующую сайт донора сплайсинга, и последовательность, кодирующую точку ветвления сплайсинга и акцепторный сайт. В некоторых вариантах осуществления, последовательность, кодирующая сайт донора сплайсинга, содержит последовательность, выделенную или полученную из гена позвоночного. В некоторых вариантах осуществления, последовательность, кодирующая сайт донора сплайсинга, содержит последовательность, выделенную или полученную из гена бета-актина (CBA) курицы (*Gallus gallus*). В некоторых вариантах осуществления, последовательность, кодирующая точку ветвления сплайсинга и акцепторный сайт, содержит последовательность, выделенную или полученную из гена позвоночного. В некоторых вариантах осуществления, последовательность, кодирующая точку ветвления сплайсинга и акцепторный сайт, содержит последовательность, выделенную или полученную из гена бета-глобина кролика (*Oryctolagus cuniculus*).

**[010]** В некоторых вариантах осуществления, композиций согласно настоящему описанию, последовательность, кодирующая 5' UTR, содержит последовательность, кодирующую последовательность Козак или ее часть. В некоторых вариантах осуществления, последовательность, кодирующая последовательность Козак по меньшей мере на 50% идентична последовательности нуклеиновой кислоты GCCRCCATGG. В некоторых вариантах осуществления, последовательность, кодирующая последовательность Козак, содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты GGCACCATGA.

**[011]** В некоторых вариантах осуществления композиций согласно настоящему описанию, последовательность, кодирующая промотор VMD2 человека, содержит или состоит из

```

1 AATTCTGTCA TTTTACTAGG GTGATGAAAT TCCCAAGCAA CACCATCCTT TTCAGATAAG
61 GGCCTGAGG CTGAGAGAGG AGCTGAAACC TACCCGGGGT CACCACACAC AGGTGGCAAG
121 GCTGGGACCA GAAACCAGGA CTGTTGACTG CAGCCCGGTA TTCATTCTTT CCATAGCCCA
181 CAGGGCTGTC AAAGACCCCA GGGCCTAGTC AGAGGCTCCT CCTTCCTGGA GAGTTCCTGG
241 CACAGAAGTT GAAGCTCAGC ACAGCCCCCT AACCCCAAC TCTCTCTGCA AGGCCTCAGG
301 GGTCAAGAACA CTGGTGGAGC AGATCCTTTA GCCTCTGGAT TTTAGGGCCA TGGTAGAGGG
361 GGTGTTGCCC TAAATTCAG CCCTGGTCTC AGCCCAACAC CCTCCAAGAA GAAATTAGAG
421 GGGCCATGGC CAGGCTGTGC TAGCCGTTGC TTCTGAGCAG ATTACAAGAA GGGACTAAGA
481 CAAGGACTCC TTTGTGGAGG TCCTGGCTTA GGGAGTCAAG TGACGGCGGC TCAGCACTCA
541 CGTGGGCAGT GCCAGCCTCT AAGAGTGGGC AGGGGCACTG GCCACAGAGT CCCAGGGAGT
601 CCCACCAGCC TAGTCGCCAG ACC (SEQ ID NO: 1) .

```

**[012]** В некоторых вариантах осуществления композиций согласно настоящему описанию, последовательность, кодирующая промотор CAG, содержит или состоит из

1 CCATTGACGT CAATAATGAC GTATGTTCCC ATAGTAACGC CAATAGGGAC TTTCCATTGA  
 61 CGTCAATGGG TGGAGTATTT ACGGTAAACT GCCCACTTGG CAGTACATCA AGTGTATCAT  
 121 ATGCCAAGTA CGCCCCCTAT TGACGTCAAT GACGGTAAAT GGCCCGCCTG GCATTATGCC  
 181 CAGTACATGA CCTTATGGGA CTTTCCTACT TGGCAGTACA TCTACGTATT AGTCATCGCT  
 241 ATTACCATGG TCGAGGTGAG CCCACGTTT TGCTTCACTC TCCCCATCTC CCCCCCTCC  
 301 CCACCCCCAA TTTTGTATTT ATTTATTTTT TAATTATTTT GTGCAGCGAT GGGGGCGGGG  
 361 GGGGGGGGGG GGC GCGCGCC AGGCGGGGCG GGGCGGGGCG AGGGGCGGGG CGGGGCGAGG  
 421 CGGAGAGGTG CGGCGGCAGC CAATCAGAGC GGC GCGCTCC GAAAGTTTCC TTTTATGGCG  
 481 AGGCGGCGGC GGC GCGCGGCC CTATAAAAAG CGAAGCGCGC GGC GGGCGGG AGTCGCTGCG  
 541 CGCTGCCTTC GCCCCGTGCC CCGCTCCGCC GCCGCTCGC GCCGCCCGCC CCGGCTCTGA  
 601 CTGACCGCGT TACTCCACA GGTGAGCGGG CGGGACGGCC CTTCTCCTCC GGGCTGTAAT  
 661 TAGCGCTTGG TTTAATGACG GCTTGTCTT TTTCTGTGGC TGCCTGAAAAG CCTTGAGGGG  
 721 CTCCGGGAGG GCCCTTTGTG CGGGGGGAGC GGCTCGGGG TGTCCGCGGG GGGACGGCTG  
 781 CCTTCGGGGG GGACGGGGCA GGGCGGGGTT CGGCTTCTGG CGTGTGACCG GCGGCTCTAG  
 841 AGCCTCTGCT AACCATGTTT ATGCCTTCTT CTTTTTCTTA CAGCTCCTGG GCAACGTGCT  
 901 GGTTATTGTG CTGTCTCATC ATTTTGGCAA AGAATTGGAT C (SEQ ID NO: 2) .

**[013]** В некоторых вариантах осуществления композиций согласно настоящему описанию,

последовательность, кодирующая белок BEST1 человека, содержит или состоит из:

1 ATGACCATCA CTTACACAAG CCAAGTGGCT AATGCCCGCT TAGGCTCCTT CTCCCGCCTG  
 61 CTGCTGTGCT GGC GGGG CAG CATCTACAAG CTGCTATATG GCGAGTTCTT AATCTTCCTG  
 121 CTCTGCTACT ACATCATCCG CTTTATTTAT AGGCTGGCCC TCACGGAAGA ACAACAGCTG  
 181 ATGTTTGAGA AACTGACTCT GTATTGCGAC AGCTACATCC AGCTCATCCC CATTTCTTTC  
 241 GTGCTGGGCT TCTACGTGAC GCTGGTCTGT ACCCGCTGGT GGAACCAGTA CGAGAACCCTG  
 301 CCGTGGCCCG ACCGCTCAT GAGCCTGGTG TCGGGCTTCG TCGAAGGCAA GGACGAGCAA  
 361 GGCCGGCTGC TGC GGGC CAC GCTCATCCGC TACGCCAACC TGGGCAACGT GCTCATCCTG  
 421 CGCAGCGTCA GCACCGCAGT CTACAAGCGC TTCCCCAGCG CCCAGCACCT GGTGCAAGCA  
 481 GGCTTTATGA CTCCGGCAGA ACACAAGCAG TTGGAGAAAC TGAGCCTACC ACACAACATG  
 541 TTCTGGGTGC CCTGGGTGTG GTTTGCCAAC CTGTCAATGA AGGCGTGGCT TGGAGTCTGA  
 601 ATCCGGGACC CTA CCTGCT CCAGAGCCTG CTGAACGAGA TGAACACCTT GCGTACTCAG  
 661 TGTGGACACC TGTATGCCTA CACTGGATT AGTATCCCAC TGGTGTATAC ACAGGTGGTG  
 721 ACTGTGGCGG TGTACAGCTT CTTCTGACT TGTCTAGTTG GGC GGCAGTT TCTGAACCCA  
 781 GCCAAGGCCT ACCCTGGCCA TGAGCTGGAC CTCGTTGTGC CCGTCTTAC GTTCTTGCAG  
 841 TTCTTCTTCT ATGTTGGCTG GCTGAAGGTG GCAGAGCAGC TCATCAACCC CTTTGGAGAG  
 901 GATGATGATG ATTTTGAGAC CAACTGGATT GTCGACAGGA ATTTGCAGGT GTCCCTGTTG  
 961 GCTGTGGATG AGATGCACCA GGACCTGCCT CGGATGGAGC CGGACATGTA CTGGAATAAG  
 1021 CCCGAGCCAC AGCCCCCTA CACAGCTGCT TCCGCCAGT TCCGTCGAGC CTCCTTTATG  
 1081 GGCTCCACCT TCAACATCAG CCTGAACAAA GAGGAGATGG AGTTCCAGCC CAATCAGGAG  
 1141 GACGAGGAGG ATGCTCACGC TGGCATCATT GGCCGCTTCC TAGGCCTGCA GTCCATGAT  
 1201 CACCATCCTC CCAGGGCAA CTCAAGGACC AAACACTGT GGC CAAGAG GGAATCCCTT  
 1261 CTCCACGAGG GCCTGCCCAA AAACCACAAG GCAGCCAAAC AGAACGTTAG GGGCCAGGAA  
 1321 GACAACAAGG CCTGGAAGCT TAAGGCTGTG GACGCTTCA AGTCTGCCCC ACTGTATCAG

1381 AGGCCAGGCT ACTACAGTGC CCCACAGACG CCCCTCAGCC CCACTCCCAT GTTCTTCCCC  
1441 CTAGAACCAT CAGCGCCGTC AAAGCTTCAC AGTGTACACAG GCATAGACAC CAAAGACAAA  
1501 AGCTTAAAGA CTGTGAGTTC TGGGGCCAAG AAAAGTTTTG AATTGCTCTC AGAGAGCGAT  
1561 GGGGCCTTGA TGGAGCACCC AGAAGTATCT CAAGTGAGGA GGAAACTGT GGAGTTTAAC  
1621 CTGACGGATA TGCCAGAGAT CCCCAGAAAT CACCTCAAAG AACCTTTGGA ACAATCACCA  
1681 ACCAACATAC ACACTACACT CAAAGATCAC ATGGATCCTT ATTGGGCCTT GGAAACAGG  
1741 GATGAAGCAC ATTCCTAA (SEQ ID NO: 3).

**[014]** В настоящем описании предложен вектор, содержащий композицию согласно настоящему описанию. В некоторых вариантах осуществления, вектор представляет собой плазмиду.

**[015]** В настоящем описании предложен вектор доставки, содержащий вектор согласно настоящему описанию. В некоторых вариантах осуществления, вектор доставки представляет собой вирусный вектор доставки. В некоторых вариантах осуществления, вектор доставки содержит одноцепочечный вирусный геном. В некоторых вариантах осуществления, вектор доставки содержит двухцепочечный вирусный геном. В некоторых вариантах осуществления, вектор доставки содержит молекулу РНК.

**[016]** В настоящем описании предложен вектор доставки, содержащий вектор согласно настоящему описанию. В некоторых вариантах осуществления, вектор доставки содержит последовательность, выделенную или полученную из вектора аденоассоциированного вируса (ААВ). В некоторых вариантах осуществления, вектор доставки содержит последовательность, выделенную или полученную из вектора ААВ серотипа ААВ1, ААВ2, ААВ3, ААВ4, ААВ5, ААВ6, ААВ7, ААВ8, ААВ9, ААВ10, ААВ11 или любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления, вектор доставки содержит последовательность, выделенную или полученную из вектора ААВ серотипа ААВ2. В некоторых вариантах осуществления, вектор доставки содержит последовательность, выделенную или полученную из вектора ААВ серотипа ААВ8. В некоторых вариантах осуществления, вектор доставки содержит последовательность, кодирующую первый инвертированный концевой повтор (ITR) и второй ITR, выделенный или полученный из вектора ААВ серотипа ААВ2, и последовательность, кодирующую вирусный ген, выделенный или полученный из вектора ААВ серотипа ААВ2. В некоторых вариантах осуществления, вектор доставки содержит последовательность, кодирующую первый инвертированный концевой повтор (ITR) и второй ITR, выделенный или полученный из вектора ААВ серотипа ААВ8, и последовательность, кодирующую вирусный ген, выделенный или полученный из вектора ААВ серотипа ААВ8. В некоторых вариантах осуществления, вектор доставки содержит последовательность, кодирующую первый инвертированный концевой повтор (ITR) и второй ITR, выделенный или полученный из вектора ААВ серотипа ААВ2, и последовательность, кодирующую вирусный ген, выделенный или полученный из вектора ААВ серотипа ААВ8.

**[017]** В настоящем описании предлагается фармацевтическая композиция, содержащая композицию в соответствии с настоящим изобретением и фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах осуществления, фармацевтически приемлемый носитель содержит TMN200.

**[018]** В настоящем описании предложена фармацевтическая композиция, содержащая вектор в соответствии с настоящим изобретением и фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах осуществления, фармацевтически приемлемый носитель содержит TMN200.

**[019]** В настоящем описании предложена фармацевтическая композиция, содержащая вектор доставки в соответствии с настоящим изобретением и фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах осуществления, фармацевтически приемлемый носитель содержит TMN200.

**[020]** В настоящем описании предложена клетка, содержащая композицию в соответствии с настоящим изобретением. В настоящем описании предложена клетка, содержащая вектор в соответствии с настоящим изобретением. В настоящем описании предложена клетка, содержащая вектор доставки в соответствии с настоящим изобретением. В настоящем описании предложена клетка, содержащая фармацевтическую композицию в соответствии с настоящим изобретением. В некоторых вариантах осуществления, клетка представляет собой клетку млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления, клетка млекопитающего представляет собой клетку приматов, отличных от человека, клетку грызунов, клетку мыши, клетку крысы или клетку кролика. В некоторых вариантах осуществления, клетка представляет собой клетку человека. В некоторых вариантах осуществления, клетка человека представляет собой нейрональную клетку, глиальную клетку, клетку сетчатки, фоторецепторную клетку, палочковидную клетку, колбочковидную клетку или кубовидную клетку пигментного эпителия сетчатки (RPE). В некоторых вариантах осуществления, клетка человека представляет собой фоторецепторную клетку. В некоторых вариантах осуществления, клетка человека представляет собой клетку HEK293 или клетку ARPE19. В некоторых вариантах осуществления, клетка человека выделена или получена из RPE сетчатки человека. В некоторых вариантах осуществления, клетка находится *in vivo*, *in vitro*, *ex vivo* или *in situ*.

**[021]** В настоящем описании предложен способ лечения макулярной дистрофии у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества композиции в соответствии с настоящим изобретением.

**[022]** В настоящем описании предлагается способ лечения макулярной дистрофии у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества композиции, содержащей вектор в соответствии с настоящим изобретением.

**[023]** В настоящем описании предлагается способ лечения макулярной дистрофии у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества композиции, содержащей вектор доставки в соответствии с настоящим изобретением.

**[024]** В некоторых вариантах осуществления способов в соответствии с настоящим изобретением, субъектом является человек. В некоторых вариантах осуществления, субъектом является примат, не являющийся человеком, собака, кошка, грызун, мышь, крыса или кролик. В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет макулярную дистрофию.

**[025]** В некоторых вариантах осуществления способов в соответствии с настоящим изобретением, субъект имеет мутацию в одной или обеих копиях гена BEST1. В некоторых вариантах осуществления, мутация наследуется как доминантная мутация. В некоторых вариантах осуществления, доминантная мутация вызывает вителлиформную макулярную дистрофию Беста (BVMD) у субъекта. В некоторых вариантах осуществления, мутация наследуется как рецессивная мутация. В некоторых вариантах осуществления, рецессивная мутация вызывает у субъекта аутосомно-рецессивную бестрофинопатию (ARB). В некоторых вариантах осуществления, мутация возникает в кодирующей последовательности одной или обеих копий гена BEST1. В некоторых вариантах осуществления, мутация возникает в некодирующей последовательности одной или обеих копий гена BEST1. В некоторых вариантах осуществления, мутация

содержит замену, вставку, делецию, инверсию, транслокацию, мутацию со сдвигом рамки или их комбинацию в одной из обеих копий гена BEST1.

**[026]** В некоторых вариантах осуществления способов по настоящему изобретению, введение включает инъекцию или инфузию субретинальным, супрахориоидальным или интравитреальным путем. В некоторых вариантах осуществления, введение включает инъекцию или инфузию субретинальным путем. В некоторых вариантах осуществления, введение включает двухэтапную инъекцию или двухэтапную инфузию субретинальным путем.

**[027]** В некоторых вариантах осуществления способов по настоящему изобретению, терапевтически эффективное количество составляет в объеме от 10 до 200 мкл, включая конечные точки. В некоторых вариантах осуществления, терапевтически эффективное количество составляет в объеме от 10 до 50 мкл, от 50 до 100 мкл, от 100 до 150 мкл или от 150 до 200 мкл, включая конечные точки для каждого диапазона. В некоторых вариантах осуществления, терапевтически эффективное количество составляет в объеме от 70 до 120 мкл, включая конечные точки, и причем введение включает инъекцию или инфузию субретинальным путем. В некоторых вариантах осуществления, терапевтически эффективное количество составляет в объеме 100 мкл, и при этом введение включает инъекцию или инфузию субретинальным путем.

**[028]** В некоторых вариантах осуществления способов согласно настоящему описанию, терапевтически эффективное количество содержит концентрацию вектора доставки AAB по меньшей мере  $1 \times 10^{10}$  DRP/мл, по меньшей мере  $1 \times 10^{11}$  DRP/мл, по меньшей мере  $1 \times 10^{12}$  DRP/мл, по меньшей мере  $2 \times 10^{12}$  DRP/мл, по меньшей мере  $5 \times 10^{12}$  DRP/мл или по меньшей мере  $1,5 \times 10^{13}$  DRP/мл. В некоторых вариантах осуществления, терапевтически эффективное количество содержит концентрацию вектора доставки AAB по меньшей мере  $2 \times 10^{12}$  DRP/мл, по меньшей мере  $5 \times 10^{12}$  DRP/мл или по меньшей мере  $1,5 \times 10^{13}$  DRP/мл. В некоторых вариантах осуществления, терапевтически эффективное количество содержит концентрацию вектора доставки AAB по меньшей мере  $5 \times 10^{12}$  DRP/мл. В некоторых вариантах осуществления, терапевтически эффективное количество содержит концентрацию вектора доставки AAB по меньшей мере  $1,5 \times 10^{13}$  DRP/мл.

**[029]** В некоторых вариантах осуществления способов согласно настоящему описанию, терапевтически эффективное количество содержит дозу из  $2 \times 10^8$  геномных частиц (гч),  $5 \times 10^8$  гч,  $1,5 \times 10^9$  гч,  $2 \times 10^9$  гч,  $5 \times 10^9$  гч,  $2 \times 10^{10}$  гч,  $5 \times 10^{10}$  гч,  $6 \times 10^{10}$  гч,  $1,2 \times 10^{11}$  гч,  $1,5 \times 10^{11}$  гч,  $2 \times 10^{11}$  гч,  $4,5 \times 10^{11}$  гч,  $5 \times 10^{11}$  гч,  $1,2 \times 10^{12}$  гч,  $1,5 \times 10^{12}$  гч,  $2 \times 10^{12}$  гч или  $5 \times 10^{12}$  гч. В некоторых вариантах осуществления, субъектом является мышь, и при этом терапевтически эффективное количество содержит дозу  $5 \times 10^8$  гч,  $1,5 \times 10^9$  гч или  $5 \times 10^9$  гч. В некоторых вариантах осуществления, субъект представляет собой примата, отличного от человека, и при этом терапевтически эффективное количество содержит дозу  $1,2 \times 10^{11}$  гч,  $4,5 \times 10^{11}$  гч или  $1,2 \times 10^{12}$  гч вирусных частиц AAB. В некоторых вариантах осуществления, субъектом является человек, и при этом терапевтически эффективное количество содержит дозу  $5 \times 10^{10}$  гч,  $1,5 \times 10^{11}$  гч,  $5 \times 10^{11}$  гч или  $1,5 \times 10^{12}$  гч вирусных частиц AAB.

**[030]** В некоторых вариантах осуществления способов согласно настоящему описанию, композиция дополнительно содержит буфер TMN200.

**[031]** В настоящем описании предложена композиция в соответствии с настоящим изобретением для использования при лечении макулярной дистрофии у субъекта, нуждающегося в этом.

**[032]** В настоящем описании предложен вектор в соответствии с настоящим изобретением для использования при лечении макулярной дистрофии у субъекта, нуждающегося в этом.

**[033]** В настоящем описании предлагается вектор доставки в соответствии с настоящим изобретением для использования при лечении макулярной дистрофии у субъекта, нуждающегося в этом.

#### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ**

**[034]** Патент или комплект материалов заявки содержит по меньшей мере один цветной графический материал. Копии этого патента или публикации заявки на патент с цветным графическим материалом(ами) будут предоставлены Ведомством по запросу и после уплаты необходимой пошлины.

**[035]** На Фиг. 1А-В представлена пара карт плазмиды, кодирующей конструкцию VMD2.IntEx.BEST1.WPRE.pA AAB2 ITR.

**[036]** На Фиг. 2А-В представлена пара карт плазмиды, кодирующей конструкцию VMD2.BEST1.WPRE.pA AAB2 ITR.

**[037]** На Фиг. 3А-С представлена серия трех карт двух плазмид, кодирующих CAG.BEST1.WPRE.pA AAB2 ITR. На Фиг. 3А и Фиг. 3В представлены две карты плазмиды CAG.BEST.WPRE.pA с селекционным маркером AmpR. На Фиг. 3С представлена карта плазмиды CAG.BEST.WPRE.pA с селективируемым маркером KanR и спейсерной последовательностью.

**[038]** На Фиг. 4 представлена карта плазмиды, кодирующая VMD2.GFP.WPRE.pA AAB2 ITR.

**[039]** На Фиг. 5 представлена карта плазмиды, кодирующая VMD2.Int.Ex.GFP.WPRE.pA AAB2 ITR.

**[040]** На Фиг. 6А-В представлена серия изображений, 6 изображений и 3 изображения, соответственно, демонстрирующие экспрессию BEST1 в клетках HEK293, трансдуцированных AAB.CAG.BEST1.pA, AAB.CAG.BEST1.WPRE.pA и нетрансдуцированных контрольных клетках. Клетки окрашивают синим красителем Hoechst и анти-hBestrophin-1. Белок Бестрофин-1 локализован по всему цитозолю

**[041]** На Фиг. 7А-В представлено изображение вестерн-блоттинга (7А) и гистограмму (7В), соответственно, показывающие экспрессию белка Бестрофин-1 и контроля бета-актина в клетках HEK293, трансдуцированных AAB.CAG.BEST1.pA (образец 1) или AAB.CAG.BEST1.WPRE.pA (образец 2), или в отрицательном контроле (образец 3). Трансфицированные плазмидой клетки HEK293 использовали в качестве положительного контроля. На Фиг. 7В проиллюстрирована количественная оценка экспрессии белка Бестрофин-1 в клетках HEK293, трансдуцированных AAB.CAG.BEST1.pA (n=9) или AAB.CAG.BEST1.WPRE.pA (n=9) или нетрансдуцированных контрольных клетках (n=8). По оси Y проиллюстрировано нормализованное значение LiCor. Планки погрешностей представляют  $\pm$  СОС. \*\*\* означает  $p < 0,001$  по сравнению с нетрансдуцированными контрольными клетками.

**[042]** На Фиг. 8А-В представлены одиночный график (8А) и серия из четырех графиков (8В), соответственно, демонстрирующие записи фиксации потенциала цельной клетки из клеток HEK293, трансдуцированных векторами AAB2/2 CAG.BEST1.pA, AAB2/2 CAG.BEST1.WPRE.pA или AAB2/2 CAG.GFP.WPRE.pA, а также нетрансдуцированных контрольных клетках. На Фиг. 8А, ток (пА) отложен по оси X от -140 до 500 с шагом 20, и напряжение (в мВ) отложено по оси Y от -200 до 500 с шагом 100. На Фиг. 8В показаны формы тока. Графики ток (I)/напряжение (V) HEK293, трансдуцированных с помощью различных векторов, и нетрансдуцированных контрольных клетках показаны по часовой стрелке от верхнего левого угла: AAB2/2 CAG.BEST1.pA, AAB2/2 CAG.BEST1.WPRE.pA, нетрансдуцированные

контрольные клетки и AAB2/2 CAG.GFP.WPRE.pA. На встроенной шкале (в центре) показано значение 250 пА по оси Y и 100 миллисекунд по оси X.

**[043]** На Фиг. 9А-В представлена пара графиков, демонстрирующих проводимость хорды клеток HEK293, трансдуцированных AAB2/2 CAG.BEST1.pA (n=10), AAB2/2 CAG.BEST1.WPRE.pA (n=10), AAB2/2 CAG.GFP.WPRE.pA (n=11) и нетрансдуцированных контрольных клетках (n=10). Проводимость хорды отложена по оси Y от 0 до 10 в единицах 2. \*\*\*\* означает  $p < 0,0001$ , \* означает  $p < 0,05$ , нз означает незначительно.

**[044]** На Фиг. 10А-В представлена пара блок-схем, показывающих два варианта осуществления процедуры эксперимента для анализа экспрессии BEST1 в дифференцированных клетках ARPE19. На Фиг. 10А продемонстрирована процедура эксперимента для анализа экспрессии BEST1 в трансфицированных дифференцированных клетках ARPE19. На Фиг. 10В продемонстрирована процедура эксперимента для анализа экспрессии BEST1 в трансфицированных и/или трансдуцированных дифференцированных клетках ARPE19.

**[045]** На Фиг. 11А-В представлена серия из 16 изображений (А) и 6 изображений (В), показывающих иммуноокрашивание BEST1 и ZO-1 трансфицированных клеток ARPE19, которые дифференцировались в течение 1 месяца. (А) В строках сверху вниз показаны клетки ARPE19 со следующими конструкциями: нетрансфицированный контроль, CAG.BEST1.WPRE, VMD2.BEST1.WPRE и VMD2.IntEx.BEST1.WPRE. Столбцы слева направо показывают: ядра, окрашенные Hoechst в синий цвет, окрашивание ZO-1 в зеленый цвет (ZO-1 является маркером поверхности цитоплазматической мембраны межклеточных плотных контактов), BEST1 в красный цвет и объединенное изображение (Hoechst, ZO-1, BEST1). Масштабный отрезок показывает 100 микрон (мкм). (В) В верхнем ряду показаны клетки ARPE19, трансфицированные VMD2.BEST1.WPRE.pA. В нижнем ряду показаны клетки ARPE19, трансфицированные VMD2.IntEx.BEST1.WPRE.pA. На изображениях слева направо показаны ZO-1 (зеленый) и BEST1 (красный), а также объединенное изображение (Hoechst, ZO-1 и BEST1). Масштабный отрезок на объединенных изображениях показывает 25 мкм.

**[046]** На Фиг. 12А-В представлена серия из 16 изображений (А) и 9 изображений (В), показывающих BEST1 и ZO-иммуноокрашивание трансфицированных клеток ARPE19, которые дифференцировались в течение 3 месяцев. (А) В строках сверху вниз показаны клетки ARPE19 со следующими конструкциями: нетрансфицированный контроль, CAG.BEST1.WPRE, VMD2.BEST1.WPRE и VMD2.IntEx.BEST1.WPRE. Столбцы слева направо показывают: ядра, окрашенные Hoechst синим, окрашивание ZO-1 зеленым, BEST1 красным и объединенное изображение (Hoechst, ZO-1, BEST1). Масштабный отрезок показывает 100 микрон (мкм). (В) Типовые изображения Фиг. 12А при большем увеличении. Строки сверху вниз показывают CAG.BEST1.WPRE, VMD2.BEST1.WPRE и VMD2.IntEx.BEST1.WPRE. Столбцы слева направо показывают окрашивание для ZO-1 зеленым, BEST1 красным и объединенное изображение, включая Hoechst синим. Масштабный отрезок на объединенных изображениях показывает 25 мкм.

**[047]** На Фиг. 13А-В продемонстрированы две серии из 8 изображений, каждая из которых демонстрирует флуоресценцию ЗФБ в клетках ARPE19, дифференцированных в течение 4 месяцев, предварительно обработанных 400 нМ доксорубицина и трансдуцированных (Фиг. 13А) AAB2/2.CAG.GFP.WPRE или (Фиг. 13В) AAB2/2.VMD2.IntEx.GFP.WPRE при 3 разных множественностях инфекции (МОИ). Используемые МОИ составляли 2, 4 и  $8 \times 10^4$  геномных частиц (гч)/клетку. Масштабный отрезок на отрицательном контроле (нетрансдуцированные и необработанные клетки) указывают 50 мкм.

Верхний ряд на каждой панели показывает необработанные контрольные клетки, нижний ряд - клетки, предварительно обработанные 400 нМ доксорубицином.

**[048]** На Фиг. 14 представлена серия из 20 изображений, показывающих иммуноокрашивание BEST1 и ZO-1 клеток ARPE19, дифференцированных в течение 4 месяцев, предварительно обработанных 400 нМ доксорубицином и трансдуцированных AAB2/2.CAG.BEST1.WPRE и AAB2/2.VMD2.IntEx.BEST1.WPRE с двумя разными MOI: 1 и  $4 \times 10^4$  гч/клетку. Строки сверху вниз показывают клетки ARPE19 со следующими вирусными векторами: нетрансдуцированный контроль, AAB2/2.CAG.BEST1.WPRE при MOI 10000 гч/клетку, AAB2/2.CAG.BEST1.WPRE при MOI 40000 гч/клетку, AAB2/2.VMD2.IntEx.BEST1.WPRE с MOI 10000 гч/клетку и AAB2/2.VMD2.IntEx.BEST1.WPRE с MOI 40000 гч/клетку. Столбцы слева направо показывают: ядра, окрашенные Hoechst синим, окрашивание ZO-1 зеленым, BEST1 красным и объединенное изображение (Hoechst, ZO-1, BEST1). Масштабные линейки показывают 50 мкм.

**[049]** На Фиг. 15 представлена таблица, описывающая протокол пилотного исследования 4/8 недель *in vivo* на мышах.

**[050]** На Фиг. 16 представлена серия из 6 изображений оптической когерентной томографии (ОКТ) глаз мыши через четыре недели после имитационной инъекции, конструкций VMD2.BEST1.WPRE или VMD2.IntEx.BEST1.WPRE AAB. В столбцах слева направо показаны мыши, которым проводили имитационную инъекцию, инъекцию конструкций VMD2.BEST1.WPRE и VMD2.IntEx.BEST1.WPRE AAB.

**[051]** На Фиг. 17 представлена серия из 3-х ОКТ-изображений глаз мыши через четыре недели после инъекции слева направо: имитационной инъекции, конструкций VMD2.BEST1.WPRE или VMD2.IntEx.BEST1.WPRE AAB. Указанные морфологические структуры представляют собой ганглиозные клетки сетчатки (RGC), внутренний плексиформный слой (IPL), внутренний ядерный слой (INL), внешний плексиформный слой (OPL), внешний ядерный слой (ONL), пигментный эпителий сетчатки (RPE). Синие и красные стрелки указывают толщину сетчатки.

**[052]** На Фиг. 18 представлена серия из 12 ОКТ-изображений глаз мыши через четыре и восемь недель после имитационной инъекции, конструкций VMD2.BEST1.WPRE или VMD2.IntEx.BEST1.WPRE AAB (столбцы слева направо). Средние сагиттальные и нецентральные изображения показаны чередующимися рядами. Два верхних ряда — это животные, изображения которых были получены через 4 недели после инъекции, а два нижних ряда — животные, изображения которых были получены через 8 недель после инъекции.

**[053]** На Фиг. 19 представлена серия из 12 изображений, полученных с помощью флуоресцентной микроскопии глаз мыши через четыре недели после имитационной инъекции, конструкций VMD2.BEST1.WPRE или VMD2.IntEx.BEST1.WPRE AAB и окрашенных анти-BEST1 (зеленый), анти-родопсин (красный) и DAPI (синий). В строках сверху вниз показаны глаза с после имитационной инъекции, глаза с введенными частицами VMD2.BEST1.WPRE или VMD2.IntEx.BEST1.WPRE AAB. В столбцах слева направо показаны анти-BEST1 (зеленый), анти-родопсин (красный), DAPI (синий) и объединенное изображение. Пигментный эпителий сетчатки (RPE), фоторецепторы (PR) и ганглиозные клетки сетчатки (RGC) указаны внизу.

**[054]** На Фиг. 20 представлена серия из 12 изображений глаз мыши через восемь недель после инъекции, в столбцах слева направо: имитационной инъекции, частиц VMD2.BEST1.WPRE или VMD2.IntEx.BEST1.WPRE AAB и окрашенные BEST1 (зеленый), родопсин (красный) и DAPI (синий).

Строки сверху вниз представляют собой объединенное изображение, изображение анти-BEST1 (также называемое huBEST1), анти-родопсин и изображение в светлом поле.

**[055]** На Фиг. 21 представлено изображение вестерн-блоттинга, показывающее экспрессию белка BEST1 в рассеченном мышном RPE и хориоидальном комплексе через четыре недели после имитационной инъекции, конструкций CAG.BEST1.WPRE, VMD2.BEST1.WPRE или VMD2.IntEx.BEST1.WPRE AAB. Синяя стрелка указывает на рекомбинантный белок Бестрофин-1 человека, а красная стрелка указывает предполагаемый размер белка BEST1. CAG.BEST1.WPRE использовали в качестве контроля. CAG представляет собой сильный промотор с конститутивной экспрессией в клетках млекопитающих. Это гибрид энхансерного элемента цитомегаловируса (CMV), промотора бета-актина курицы (CBA) и акцептора сплайсинга гена бета-глобина кролика.

**[056]** На Фиг. 22 представлена таблица, описывающая протокол исследования 4/13 недель *in vivo* для подтверждения концепции (PoC) на мышах.

**[057]** На Фиг. 23 представлена серия из 20 ОКТ-изображений глаз мыши через четыре недели и 13 недель после имитационной инъекции, конструкций VMD2.IntEx.BEST1.WPRE или VMD2.BEST1.WPRE AAB в двух разных дозах ( $1 \times 10^8$  GC/мкл/глаз и  $1 \times 10^9$  GC/мкл/глаз). Среднесагиттальный (верхний ряд) и нецентральный (нижний) вид изображения показаны чередующимися рядами.

**[058]** На Фиг. 24 представлена серия из 20 полученных при помощи микроскопа изображений глаз мыши через четыре недели после имитационной инъекции, конструкций VMD2.IntEx.BEST1.WPRE или VMD2.BEST1.WPRE AAB в двух разных дозировках ( $1 \times 10^8$  GC/мкл/глаз и  $1 \times 10^9$  GC/мкл/глаз) и окрашенных анти-BEST1 (huBEST1, зеленый), анти-Родопсин (красный) и DAPI (синий). Также показаны изображения в светлом поле (нижний ряд). Столбцы слева направо показывают VMD2.IntEx.BEST1.WPRE при  $1 \times 10^8$  GC/мкл/глаз, VMD2.IntEx.BEST1.WPRE при  $1 \times 10^9$  GC/мкл/глаз, VMD2.BEST1.WPRE при  $1 \times 10^8$  GC/мкл/глаз и VMD2.BEST1.WPRE при  $1 \times 10^9$  GC/мкл/глаз. Строки сверху вниз показывают: объединенное изображение, анти-BEST1, анти-родопсин и светлое поле. Анатомические структуры, указанные на верхнем левом изображении, представляют внутренний ядерный слой (INL), внешний ядерный слой (ONL), внешний сегмент (OS), пигментный эпителий сетчатки (RPE) и сосудистую оболочку.

**[059]** На Фиг. 25А-В представлена пара изображений вестерн-блоттинга, изучающих экспрессию белка BEST1 в клетках или инъекцированный мышный RPE и комплекс сосудистой оболочки. На Фиг. 25А представлен вестерн-блоттинг, показывающий экспрессию белка Бестрофин-1 и контроля бета-актина в клетках HEK293 и ARPE-19, трансфицированных pCAG.BEST1.WPRE, pVMD2.BEST1.WPRE и pVMD2.IntEx.BEST1.WPRE или нетрансфицированном образце в качестве отрицательного контроля. На Фиг. 25В представлен вестерн-блоттинг, показывающий белок BEST1 в изолированных образцах RPE и хориоидеи мышей, которым инъекцировали либо высокую дозу ( $1 \times 10^9$  GC/мкл/глаз), либо низкую дозу ( $1 \times 10^8$  GC/мкл/глаз) VMD2.IntEx.BEST1.WPRE, либо частицы VMD2.BEST1.WPRE AAB.

**[060]** На Фиг. 26 представлена таблица, показывающая план исследования для анализа экспрессии BEST1 человека с помощью иммуногистохимии и вестерн-блоттинга у мышей, которым вводили AAB2/2.VMD2.IntEx.BEST1.WPRE.

**[061]** На Фиг. 27 представлена таблица, показывающая протокол предлагаемого исследования согласно надлежащей лабораторной практике (НЛП) для оценки потенциальной токсичности у мышей.

**[062]** На Фиг. 28 представлена таблица, показывающая протокол оценки токсичности материалов исследования через 4 недели.

**[063]** На Фиг. 29 представлена таблица, показывающая протокол предлагаемого исследования согласно надлежащей лабораторной практике (НЛП) для оценки потенциальной токсичности для всех приматов, кроме человека.

**[064]** На Фиг. 30 представлена таблица, показывающая режим дозирования для мышей, всех приматов, кроме человека, и эквивалентных доз для человека в геномных частицах (гч) с использованием вирусного вектора BEST1 AAB в соответствии с настоящим изобретением. Вирусный вектор BEST1 AAB для предлагаемых доз имеет концентрацию  $2 \times 10^{12}$  DRP/мл и изготовлен в соответствии с действующими стандартами надлежащей производственной практики (НПП).

**[065]** На Фиг. 31 представлена таблица, показывающая схему введения доз и требуемые концентрации устойчивых к ДНКазе частиц (DRP) и количество геномных частиц (гч) на дозу у мышей, всех приматов, отличных от человека, и человека, вирусного вектора BEST1 AAB в соответствии с настоящим изобретением.

### **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

**[066]** Настоящее изобретение относится к открытию того, что во многих случаях макулярная дегенерация может быть вызвана мутациями или аномальной функцией белка Бестрофин-1 (BEST1, также известного как VMD2). Желтое пятно представляет собой область около центра сетчатки, отвечающая за центральное цветное зрение с высоким разрешением. Ямка, расположенная недалеко от центра желтого пятна, содержит наибольшую концентрацию фоторецепторов колбочек в глазу. Мутации в гене, называемом Бестрофин-1 (BEST1 или BEST1 человека (hBEST1), также известный как VMD2) ассоциированы по меньшей мере с пятью различными заболеваниями дегенерации сетчатки, называемыми бестринопатиями. Бестринопатии включают вителлиформную макулярную дистрофию Беста вителлиформная макулярная дистрофия (BVMD), аутосомно-рецессивную бестрофинопатию, приобретенную вителлиформную макулярную дистрофию, аутосомно-доминантную витреоретинохориоидопатию и пигментной дистрофии сетчатки. Эти мутации могут быть как доминантными (например, BVMD), так и рецессивными. Вителлиформная макулярная дистрофия Беста (BVMD) и аутосомно-рецессивная бестрофинопатия могут вызывать дегенерацию желтого пятна с началом в позднем детском или подростковом возрасте. Однако, в некоторых случаях макулярная дегенерация начинается в зрелом возрасте. Однако, независимо от возраста начала, бестринопатия может оказывать разрушительное влияние на зрение, и в настоящее время не существует известного эффективного лечения. Учитывая ключевую роль, которую функция BEST1 играет в бестрофинопатиях, одним из подходов к лечению бестрофинопатии является доставка функционального белка BEST1 к пораженным клеткам пациента.

#### *Бестрофин-1 (BEST1)*

**[067]** Бестрофин-1 (BEST1) представляет собой интегральный мембранный белок, обнаруживаемый в основном в пигментном эпителии сетчатки глаза (RPE) и преимущественно локализованный на базолатеральной плазматической мембране. Считается, что белок BEST1 действует как ионный канал и регулятор передачи внутриклеточной кальциевой сигнализации. BEST1 человека можно найти в базе данных NCBI с номерами доступа NP\_004174.1 и NM\_004183.3, содержание которых полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

**[068]** В некоторых вариантах осуществления композиций согласно настоящему описанию, последовательность, кодирующая белок BEST1 согласно настоящему описанию, содержит или состоит из

аминокислотной последовательности по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичной последовательности:

```
1 MTITYTSQVA NARLGSFSRL LLCWRGSIYK LLYGEFLIFL LCYYIIRFIY RLALTEEQQL
61 MFEKLTLYCD SYIQLIPISF VLGIFYVTLVV TRWWNQYENL PWPDRMLSLV SGFVEGKDEQ
121 GRLLRRTLIR YANLGNVLIL RSVSTAVYKR FPSAQHLVQA GFMTPAENKQ LEKLSLPHNM
181 FWVPWVWFAN LSMKAWLGGR IRDPILLQSL LNMNTLRTQ CGHLYAYDWI SIPLVYTQVV
241 TVAVYSFFLT CLVGRQFLNP AKAYPGHELD LVVPVFTFLQ FFFYVWGLKV AEQLINPFGE
301 DDDDFETNWI VDRNLQVSL AVDEMHDLP RMEPDMYWNK PEPQPPYTAA SAQFRRASFM
361 GSTFNISLNK EEMEFQPNQE DEEDAHAGII GRFLGLQSHD HHP PRANSRT KLLWPKRESL
421 LHEGLPKNHK AAKQNVRGQE DNKAWKLVAV DAFKSAPLYQ RPYYSAPQT PLSPTPMFFP
481 LEPSAPSKLH SVTGIDTKDK SLKTVSSGAK KSFELLSESD GALMEHPEVS QVRRKTVEFN
541 LTDMP EIPEN HLKEPLEQSP TNIHTTLKDH MDPYWALENR DEAHS (SEQ ID NO: 4) .
```

**[069]** В некоторых вариантах осуществления композиций согласно настоящему описанию, последовательность, кодирующая белок BEST1 согласно настоящему описанию, содержит или состоит из аминокислотной последовательности:

```
1 MTITYTSQVA NARLGSFSRL LLCWRGSIYK LLYGEFLIFL LCYYIIRFIY RLALTEEQQL
61 MFEKLTLYCD SYIQLIPISF VLGIFYVTLVV TRWWNQYENL PWPDRMLSLV SGFVEGKDEQ
121 GRLLRRTLIR YANLGNVLIL RSVSTAVYKR FPSAQHLVQA GFMTPAENKQ LEKLSLPHNM
181 FWVPWVWFAN LSMKAWLGGR IRDPILLQSL LNMNTLRTQ CGHLYAYDWI SIPLVYTQVV
241 TVAVYSFFLT CLVGRQFLNP AKAYPGHELD LVVPVFTFLQ FFFYVWGLKV AEQLINPFGE
301 DDDDFETNWI VDRNLQVSL AVDEMHDLP RMEPDMYWNK PEPQPPYTAA SAQFRRASFM
361 GSTFNISLNK EEMEFQPNQE DEEDAHAGII GRFLGLQSHD HHP PRANSRT KLLWPKRESL
421 LHEGLPKNHK AAKQNVRGQE DNKAWKLVAV DAFKSAPLYQ RPYYSAPQT PLSPTPMFFP
481 LEPSAPSKLH SVTGIDTKDK SLKTVSSGAK KSFELLSESD GALMEHPEVS QVRRKTVEFN
541 LTDMP EIPEN HLKEPLEQSP TNIHTTLKDH MDPYWALENR DEAHS (SEQ ID NO: 4) .
```

**[070]** В некоторых вариантах осуществления композиций согласно настоящему описанию, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая белок BEST1 согласно настоящему описанию, содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичной последовательности нуклеиновой кислоты:

```
1 ATGACCATCA CTTACACAAG CCAAGTGGCT AATGCCCGCT TAGGCTCCTT CTCCGCCTG
61 CTGCTGTGCT GCGGGGCGAG CATCTACAAG CTGCTATATG GCGAGTCTT AATCTTCCTG
121 CTCTGCTACT ACATCATCCG CTTTATTTAT AGGCTGGCCC TCACGGAAGA ACAACAGCTG
181 ATGTTTGAGA AACTGACTCT GTATTGCGAC AGCTACATCC AGCTCATCCC CATTTCCCTC
241 GTGCTGGGCT TCTACGTGAC GCTGGTCTGT ACCCGCTGGT GGAACAGTA CGAGAACCCTG
301 CCGTGGCCCG ACCGCCTCAT GAGCCTGGTG TCGGGCTTCG TCGAAGGCAA GGACGAGCAA
361 GGCCGGCTGC TGC GGCGCAC GCTCATCCGC TACGCCAAC TGGGCAACGT GCTCATCCTG
421 CGCAGCGTCA GCACCGCAGT CTACAAGCGC TTCCCAGCG CCCAGCACCT GTTGCAAGCA
481 GGCTTTATGA CTCCGGCAGA ACACAAGCAG TTGGAGAAAC TGAGCCTACC ACACAACATG
541 TTCTGGGTGC CCTGGGTGTG GTTTGCCAAC CTGTCAATGA AGGCGTGGCT TGGAGGTCGA
```

601 ATCCGGGACC CTATCCTGCT CCAGAGCCTG CTGAACGAGA TGAACACCTT GCGTACTCAG  
661 TGTGGACACC TGTATGCCTA CGACTGGATT AGTATCCCAC TGGTGTATAC ACAGGTGGTG  
721 ACTGTGGCGG TGTACAGCTT CTTCTGACT TGTCTAGTTG GCGGCAGTT TCTGAACCCA  
781 GCCAAGGCCT ACCCTGGCCA TGAGCTGGAC CTCGTTGTGC CCGTCTTCAC GTTCTGCAG  
841 TTCTTCTTCT ATGTTGGCTG GCTGAAGGTG GCAGAGCAGC TCATCAACCC CTTTGGAGAG  
901 GATGATGATG ATTTTGAGAC CAACTGGATT GTCGACAGGA ATTTGCAGGT GTCCCTGTTG  
961 GCTGTGGATG AGATGCACCA GGACCTGCCT CGGATGGAGC CGGACATGTA CTGGAATAAG  
1021 CCCGAGCCAC AGCCCCCTA CACAGCTGCT TCCGCCAGT TCCGTCGAGC CTCCTTTATG  
1081 GGCTCCACCT TCAACATCAG CCTGAACAAA GAGGAGATGG AGTTCCAGCC CAATCAGGAG  
1141 GACGAGGAGG ATGCTCACGC TGGCATCATT GGCCGCTTCC TAGGCCTGCA GTCCCATGAT  
1201 CACCATCCTC CCAGGGCAAA CTCAAGGACC AAACACTGTG GGCCCAAGAG GGAATCCCTT  
1261 CTCCACGAGG GCCTGCCCAA AAACCACAAG GCAGCCAAAC AGAACGTTAG GGGCCAGGAA  
1321 GACAACAAGG CCTGGAAGCT TAAGGCTGTG GACGCCTTCA AGTCTGCCCC ACTGTATCAG  
1381 AGGCCAGGCT ACTACAGTGC CCCACAGACG CCCCTCAGCC CCACTCCCAT GTTCTTCCCC  
1441 CTAGAACCAT CAGCGCCGTC AAAGCTTCAC AGTGTACAG GCATAGACAC CAAAGACAAA  
1501 AGCTTAAAGA CTGTGAGTTC TGGGGCCAAG AAAAGTTTTG AATTGCTCTC AGAGAGCGAT  
1561 GGGGCCTTGA TGGAGCACCC AGAAGTATCT CAAGTGAGGA GGAAAACGTG GGAGTTTAAC  
1621 CTGACGGATA TGCCAGAGAT CCCCAGAAAAT CACCTCAAAG AACCTTTGGA ACAATCACCA  
1681 ACCAACATAC ACACTACACT CAAAGATCAC ATGGATCCTT ATTGGGCCTT GGAAAACAGG  
1741 GATGAAGCAC ATTCCTAA (SEQ ID NO: 3).

**[071]** В некоторых вариантах осуществления композиций согласно настоящему описанию, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая белок BEST1 согласно настоящему описанию, содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты:

1 ATGACCATCA CTTACACAAG CCAAGTGGCT AATGCCCCGCT TAGGCTCCTT CTCCCGCCTG  
61 CTGCTGTGCT GCGGGGCGAG CATCTACAAG CTGCTATATG GCGAGTTCTT AATCTTCTG  
121 CTCTGCTACT ACATCATCCG CTTTATTTAT AGGCTGGCCC TCACGGGAAGA ACAACAGCTG  
181 ATGTTTGAAGA AACTGACTCT GTATTGCGAC AGCTACATCC AGCTCATCCC CATTTCTTCT  
241 GTGCTGGGCT TCTACGTGAC GCTGGTCTGT ACCCGCTGGT GGAACCAGTA CGAGAACCCTG  
301 CCGTGGCCCC ACCGCCTCAT GAGCCTGGTG TCGGGCTTCG TCGAAGGCAA GGACGAGCAA  
361 GGCCGGCTGC TCGGGCGCAC GCTCATCCGC TACGCCAACC TGGCAACGT GCTCATCCTG  
421 CGCAGCGTCA GCACCGCAGT CTACAAGCGC TTCCCCAGCG CCCAGCACCT GGTGCAAGCA  
481 GGCTTTATGA CTCCGGCAGA ACACAAGCAG TTGGAGAAAC TGAGCCTACC ACACAACATG  
541 TTCTGGGTGC CCTGGGTGTG GTTTGCCAAC CTGTCAATGA AGGCGTGGCT TGGAGGTCGA  
601 ATCCGGGACC CTATCCTGCT CCAGAGCCTG CTGAACGAGA TGAACACCTT GCGTACTCAG  
661 TGTGGACACC TGTATGCCTA CGACTGGATT AGTATCCCAC TGGTGTATAC ACAGGTGGTG  
721 ACTGTGGCGG TGTACAGCTT CTTCTGACT TGTCTAGTTG GCGGCAGTT TCTGAACCCA  
781 GCCAAGGCCT ACCCTGGCCA TGAGCTGGAC CTCGTTGTGC CCGTCTTCAC GTTCTGCAG  
841 TTCTTCTTCT ATGTTGGCTG GCTGAAGGTG GCAGAGCAGC TCATCAACCC CTTTGGAGAG  
901 GATGATGATG ATTTTGAGAC CAACTGGATT GTCGACAGGA ATTTGCAGGT GTCCCTGTTG  
961 GCTGTGGATG AGATGCACCA GGACCTGCCT CGGATGGAGC CGGACATGTA CTGGAATAAG  
1021 CCCGAGCCAC AGCCCCCTA CACAGCTGCT TCCGCCAGT TCCGTCGAGC CTCCTTTATG  
1081 GGCTCCACCT TCAACATCAG CCTGAACAAA GAGGAGATGG AGTTCCAGCC CAATCAGGAG

1141 GACGAGGAGG ATGCTCACGC TGGCATCATT GGCCGCTTCC TAGGCCTGCA GTCCCATGAT  
1201 CACCATCCTC CCAGGGCAAA CTCAAGGACC AAACТАCTGT GGCCCAAGAG GGAATCCCTT  
1261 CTCCACGAGG GCCTGCCCAA AAACCACAAG GCAGCCAAAC AGAACGTTAG GGGCCAGGAA  
1321 GACAACAAGG CCTGGAAGCT TAAGGCTGTG GACGCCTTCA AGTCTGCCCC ACTGTATCAG  
1381 AGGCCAGGCT ACTACAGTGC CCCACAGACG CCCCTCAGCC CCACTCCCAT GTTCTTCCCC  
1441 CTAGAACCAT CAGCGCCGTC AAAGCTTCAC AGTGTСACAG GCATAGACAC CAAAGACAAA  
1501 AGCTTAAAGA CTGTGAGTTC TGGGGCCAAG AAAAGTTTTG AATTGCTCTC AGAGAGCGAT  
1561 GGGGCCTTGA TGGAGCACCC AGAAGTATCT CAAGTGAGGA GGAAAACTGT GGAGTTTAAС  
1621 CTGACGGATA TGCCAGAGAT CCCCГAAАAT CACCTCAAAG AACCTTTGGA ACAATCACCA  
1681 ACCAACATAC ACACTACACT CAAAGATCAC ATGGATCCTT ATTGGGCCTT GGAAAAСAGG  
1741 GATGAAGCAC ATTCCTAA (SEQ ID NO: 3).

**[072]** В некоторых вариантах осуществления композиций согласно настоящему описанию, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая белок BEST1 согласно настоящему описанию, содержит кодон-оптимизированную последовательность. В некоторых вариантах осуществления, последовательность является кодон-оптимизированной для экспрессии в клетке млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления, последовательность является кодон-оптимизированной для экспрессии в клетке человека.

#### *Экспрессия BEST1*

**[073]** В некоторых вариантах осуществления композиций согласно настоящему описанию, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая белок BEST1 согласно настоящему описанию, дополнительно содержит последовательность, кодирующую регуляторный элемент, который усиливает или увеличивает экспрессию транскрипта BEST1 или белка BEST1. Типовой регуляторный элемент, который усиливает или увеличивает экспрессию транскрипта BEST1 или белка BEST1, включает, но не ограничивается этим, промотор, энхансер, суперенхансер, интрон, экзон, комбинацию интрона и экзона, последовательность, кодирующую нетранслируемую область (например, 5'-нетранслируемую область (UTR) или 3' UTR), последовательность, содержащую сигнал полиаденилирования (полиА) и посттранскрипционный регуляторный элемент (PRE).

**[074]** Типовые промоторы в соответствии с настоящим изобретением включают, но не ограничиваются ими, те промоторы, которые способны экспрессировать последовательность, кодирующую белок BEST1 или белок BEST1 в клетке млекопитающего. Типовые промоторы в соответствии с настоящим изобретением включают, но не ограничиваются ими, те промоторы, которые способны экспрессировать последовательность, кодирующую белок BEST1 или белок BEST1 в клетке человека. В некоторых вариантах осуществления, клетка млекопитающего или человека может находиться *in vivo*, *ex vivo*, *in vitro* или *in situ*. В некоторых вариантах осуществления, промотор может быть конститутивно активным. В некоторых вариантах осуществления, промотор может быть специфическим для соответствующих типов клеток. В некоторых вариантах осуществления, промотор может быть индуцируемым.

**[075]** Типовые конститутивно активные промоторы согласно настоящему описанию включают, но не ограничиваются ими, вирусный промотор. Вирусные промоторы в соответствии с настоящим изобретением могут включать, но не ограничиваются ими, промотор вируса обезьян 40 (SV40), промотор цитомегаловируса (CMV), промотор убиквитина С (UBC), промотор фактора элонгации 1-альфа (EF1A),

промотор фосфоглицераткиназы 1 (PGK) и промотор СAG (комбинация (С) раннего энхансерного элемента цитомегаловируса (CMV), (А) промотора, содержащего первый экзон и первый интрон гена бета-актина курицы, и (G) акцептор сплайсинга гена бета-глобина кролика). В некоторых вариантах осуществления, промотор CMV используется для контроля экспрессии последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей белок BEST1 в соответствии с настоящим изобретением. В некоторых вариантах осуществления, промотор СAG используется для контроля экспрессии последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей белок BEST1 в соответствии с настоящим изобретением. Невирусные промоторы в соответствии с настоящим изобретением могут включать, но не ограничиваются этим, промотор бета-актина курицы (СВА). В некоторых вариантах осуществления, промотор СВА содержит первый экзон и интрон гена СВА бета-актина курицы. В некоторых вариантах осуществления, промотор содержит промотор бета-актина курицы и раннего энхансерного элемента цитомегаловируса. В некоторых вариантах осуществления, промотор дополнительно содержит последовательность акцептора сплайсинга бета-глобина кролика (промотор СAG). В некоторых вариантах осуществления, промотор СAG содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичной последовательности нуклеиновой кислоты:

```

1  CCATTGACGT  CAATAATGAC  GTATGTTCCC  ATAGTAACGC  CAATAGGGAC  TTTCCATTGA
61  CGTCAATGGG  TGGAGTATTT  ACGGTAACCT  GCCCACTTGG  CAGTACATCA  AGTGTATCAT
121 ATGCCAAGTA  CGCCCCCTAT  TGACGTCAAT  GACGGTAAAT  GGCCCGCCTG  GCATTATGCC
181 CAGTACATGA  CCTTATGGGA  STTTCCTACT  TGGCAGTACA  TCTACGTATT  AGTCATCGCT
241 АТТАССАТGG  TCGAGGTGAG  CCCCACGTTT  TGCTTCACTC  TCCCCATCTC  CCCCCCTCC
301 CCACCCSCAA  TTTTGTATTT  ATTTATTTTT  TAATTATTTT  GTGCAGCGAT  GGGGGCGGGG
361 GGGGGGGGGG  GCGCGCGGCC  AGGCGGGGCG  GGGCGGGGCG  AGGGGCGGGG  CGGGGCGAGG
421 CGGAGAGGTG  CGGCGGCAGC  CAATCAGAGC  GCGCGCTCC  GAAAGTTTCC  TTTTATGGCG
481 AGGCGGCGGC  GCGGCGGGCC  CTATAAAAAG  CGAAGCGCGC  GCGGGCGGG  AGTCGCTGCC
541 CGCTGCCTTC  GCCCCGTGCC  CCGCTCCGCC  GCCGCCCTCG  GCCGCCCGCC  CCGGCTCTGA
601 CTGACCGCGT  TACTCCSACA  GGTGAGCGGG  CGGGACGGCC  STTCTCCTCC  GGGCTGTAAT
661 TAGCGCTTGG  TTTAATGACG  GCTTGTTTCT  TTTCTGTGGC  TCGGTGAAAAG  CCTTGAGGGG
721 CTCCGGGAGG  GCCSTTTGTG  CGGGGGGAGC  GGCTCGGGGC  TGTCCGCGGG  GGGACGGCTG
781 CCTTCGGGGG  GGACGGGGCA  GGGCGGGGTT  CGGCTTCTGG  CGTGTGACCG  GCGGCTCTAG
841 AGCCTCTGCT  AACCATGTTT  ATGCCTTCTT  STTTTTCTTA  CAGCTCCTGG  GCAACGTGCT
901 GGTTATTGTG  CTGTCTCATC  ATTTTGGCAA  AGAATTGGAT  C (SEQ ID NO: 2) .

```

**[076]** Типовые специфические для соответствующих типов клеток промоторы в соответствии с настоящим изобретением, включают, но не ограничиваются ими, промотор, способный экспрессировать нуклеиновую кислоту или белок в нейроне, промотор, способный экспрессировать нуклеиновую кислоту или белок в клетке сетчатки, промотор способный экспрессировать нуклеиновую кислоту или белок в фоторецепторе, промотор, способный экспрессировать нуклеиновую кислоту или белок в палочковидной клетке, и промотор, способный экспрессировать нуклеиновую кислоту или белок в колбочковидной клетке. В некоторых вариантах осуществления, последовательность, кодирующая специфический для соответствующих тканей промотор, содержит последовательность, кодирующую ген VMD2 человека (также известный как Бестрофин-1). В некоторых вариантах осуществления, специфический для соответствующих

тканей промотор содержит промотор VMD2 человека (также известный как Бестрофин-1). В некоторых вариантах осуществления, промотор VMD2 человека содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99 % идентичной последовательности нуклеиновой кислоты:

```
1 AATTCTGTCA TTTTACTAGG GTGATGAAAT TCCCAAGCAA CACCATCCTT TTCAGATAAG
61 GGCAC TGAGG CTGAGAGAGG AGCTGAAACC TACCCGGGGT CACCACACAC AGGTGGCAAG
121 GCTGGGACCA GAAACCAGGA CTGTTGACTG CAGCCCGGTA TTCATTCTTT CCATAGCCCA
181 CAGGGCTGTC AAAGACCCCA GGGCCTAGTC AGAGGCTCCT CCTTCCTGGA GAGTTCCTGG
241 CACAGAAGTT GAAGCTCAGC ACAGCCCCCT AACCCCAAC TCTCTCTGCA AGGCCTCAGG
301 GGT CAGAACA CTGGTGGAGC AGATCCTTTA GCCTCTGGAT TTTAGGGCCA TGGTAGAGGG
361 GGTGTTGCCC TAAATTCCAG CCCTGGTCTC AGCCCAACAC CCTCCAAGAA GAAATTAGAG
421 GGGCCATGGC CAGGCTGTGC TAGCCGTTGC TTCTGAGCAG ATTACAAGAA GGGACTAAGA
481 CAAGGACTCC TTTGTGGAGG TCCTGGCTTA GGGAGTCAAG TGACGGCGGC TCAGCACTCA
541 CGTGGGCAGT GCCAGCCTCT AAGAGTGGGC AGGGGCACTG GCCACAGAGT CCCAGGGAGT
601 CCCACCAGCC TAGTCGCCAG ACC (SEQ ID NO: 1) .
```

**[077]** В некоторых вариантах осуществления, промотор VMD2 человека содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты на 100% идентичной последовательности нуклеиновой кислоты:

```
1 AATTCTGTCA TTTTACTAGG GTGATGAAAT TCCCAAGCAA CACCATCCTT TTCAGATAAG
61 GGCAC TGAGG CTGAGAGAGG AGCTGAAACC TACCCGGGGT CACCACACAC AGGTGGCAAG
121 GCTGGGACCA GAAACCAGGA CTGTTGACTG CAGCCCGGTA TTCATTCTTT CCATAGCCCA
181 CAGGGCTGTC AAAGACCCCA GGGCCTAGTC AGAGGCTCCT CCTTCCTGGA GAGTTCCTGG
241 CACAGAAGTT GAAGCTCAGC ACAGCCCCCT AACCCCAAC TCTCTCTGCA AGGCCTCAGG
301 GGT CAGAACA CTGGTGGAGC AGATCCTTTA GCCTCTGGAT TTTAGGGCCA TGGTAGAGGG
361 GGTGTTGCCC TAAATTCCAG CCCTGGTCTC AGCCCAACAC CCTCCAAGAA GAAATTAGAG
421 GGGCCATGGC CAGGCTGTGC TAGCCGTTGC TTCTGAGCAG ATTACAAGAA GGGACTAAGA
481 CAAGGACTCC TTTGTGGAGG TCCTGGCTTA GGGAGTCAAG TGACGGCGGC TCAGCACTCA
541 CGTGGGCAGT GCCAGCCTCT AAGAGTGGGC AGGGGCACTG GCCACAGAGT CCCAGGGAGT
601 CCCACCAGCC TAGTCGCCAG ACC (SEQ ID NO: 1) .
```

**[078]** В некоторых вариантах осуществления композиций согласно настоящему изобретению, последовательность нуклеиновой кислоты, содержащая последовательность, кодирующую белок BEST1, и последовательность, кодирующую промотор, дополнительно содержит интрон и экзон. Присутствие интрона и экзона увеличивает уровень экспрессии белка. В некоторых вариантах осуществления, интрон расположен между промотором VMD2 и экзоном. В некоторых вариантах осуществления, включая те варианты осуществления, в которых интрон расположен между промотором VMD2 и экзоном, причем экзон расположен на 5' кодирующей последовательности BEST.

**[079]** Экзон может содержать кодирующую последовательность, некодирующую последовательность или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления, экзон содержит некодирующую последовательность. В некоторых вариантах осуществления, экзон выделен или получен из гена млекопитающего. В вариантах осуществления настоящего изобретения, млекопитающее представляет собой кролика (*Oryctolagus cuniculus*). В некоторых вариантах осуществления, ген млекопитающего содержит ген

бета-глобина кролика. В некоторых вариантах осуществления, экзон содержит последовательность нуклеиновой кислоты по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную последовательности нуклеиновой кислоты:

CTCCTGGGCA ACGTGCTGGT TATTGTGCTG TCTCATCATT TTGGCAAAGA ATT (SEQ ID NO: 6).

**[080]** В некоторых вариантах осуществления, экзон содержит последовательность нуклеиновой кислоты на 100% идентичную последовательности нуклеиновой кислоты:

CTCCTGGGCA ACGTGCTGGT TATTGTGCTG TCTCATCATT TTGGCAAAGA ATT (SEQ ID NO: 6).

**[081]** Интроны могут содержать сайт донора сплайсинга, сайт акцептора сплайсинга или точку ветвления. Интроны могут содержать сайт донора сплайсинга, сайт акцептора сплайсинга и точку ветвления. Типовые сайты донора сплайсинга включают нуклеотиды «GT» («GU» в пре-мРНК) на 5'-конце интрона. Типовые сайты акцептора сплайсинга содержат «AG» на 3'-конце интрона. В некоторых вариантах осуществления, точка ветвления содержит аденозин (A) между 20 и 40 нуклеотидами, включая конечные точки, выше 3'-конца интрона. Интрон может быть искусственным или не встречающейся в природе последовательностью. Альтернативно, интрон может быть выделен или получен из гена позвоночного. Интрон может содержать последовательность, кодирующую слияние двух последовательностей, каждая из которых может быть выделена или получена из множества генов позвоночных. В некоторых вариантах осуществления, ген позвоночного, вносящий вклад в последовательность нуклеиновой кислоты интрона, содержит ген курицы (*Gallus gallus*). В некоторых вариантах осуществления, ген курицы содержит ген бета-актина курицы. В некоторых вариантах осуществления, ген позвоночного, вносящий вклад в последовательность нуклеиновой кислоты интрона, содержит ген кролика (*Oryctolagus cuniculus*). В некоторых вариантах осуществления, ген кролика содержит ген бета-глобина кролика. В некоторых вариантах осуществления, интрон содержит последовательность нуклеиновой кислоты по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную последовательности нуклеиновой кислоты:

1 GTGCCGCAGG GGGACGGCTG CCTTCGGGGG GGACGGGGCA GGGCGGGGTT CGGCTTCTGG  
61 CGTGTGACCG GCGGCTCTAG AGCCTCTGCT AACCATGTTT ATGCCTTCTT CTTTTTCCTA  
121 CAG (SEQ ID NO: 7).

**[082]** В некоторых вариантах осуществления, интрон содержит последовательность нуклеиновой кислоты на 100% идентичную последовательности нуклеиновой кислоты:

1 GTGCCGCAGG GGGACGGCTG CCTTCGGGGG GGACGGGGCA GGGCGGGGTT CGGCTTCTGG  
61 CGTGTGACCG GCGGCTCTAG AGCCTCTGCT AACCATGTTT ATGCCTTCTT CTTTTTCCTA  
121 CAG (SEQ ID NO: 7).

**[083]** Последовательности Козак представляют собой мотивы короткой последовательности, которые распознаются рибосомой в качестве сайта начала трансляции. Последовательности Козак могут быть расположены непосредственно перед сайтом начала трансляции или вокруг него. У позвоночных консенсусная последовательность Козак содержит последовательность по меньшей мере на 50% идентичную консенсусной последовательности gccRccATGG, где R представляет собой A или G, а ATG, кодирующая начальный метионин, выделена жирным шрифтом. Типовая последовательность Козак согласно настоящему изобретению содержит последовательность GGCACCATGA. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую BEST1, дополнительно содержит последовательность, кодирующую 5' нетранслируемую

последовательность (5' UTR). В некоторых вариантах осуществления, 5' UTR содержит последовательность Козак. В некоторых вариантах осуществления, 5' UTR содержит часть последовательности Козак. В некоторых вариантах осуществления, 5' UTR содержит по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70% или по меньшей мере 80% последовательности Козак.

**[084]** В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую BEST1, дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую транскрипционный элемент отклика (PRE). Примеры PRE включают PRE сурка (WPRE), который происходит от вируса гепатита сурка. В некоторых вариантах осуществления, последовательность, кодирующая WPRE, расположена в 3' последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей BEST1. В некоторых вариантах осуществления, последовательность, кодирующая WPRE, расположена между нуклеотидной последовательностью, кодирующей BEST1, и последовательностью, кодирующей сигнал полиА. В некоторых вариантах осуществления, последовательность, кодирующая WPRE, содержит последовательность нуклеиновой кислоты по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную последовательности нуклеиновой кислоты:

```
1 ATCGATAATC AACCTCTGGA TTACAAAATT TGTGAAAGAT TGACTGGTAT TCTTAACTAT
61 GTTGCTCSTT TTACGSTATG TGGATACGCT GCTTTAATGC CTTTGATATCA TGCTATTGCT
121 TCCCGTATGG STTTCATTTT CTCCTCCTTG TATAAATCCT GGTGCTGTC TCTTTATGAG
181 GAGTTGTGGC CCGTTGTCAG GCAACGTGGC GTGGTGTGCA CTGTGTTTGC TGACGCAACC
241 CCCACTGGTT GGGGCATTGC CACCACCTGT CAGCTCCTTT CCGGGACTTT CGCTTTCCCC
301 CTCCTATTG CCACGGCGGA ACTCATCGCC GCCTGCCTTG CCCGCTGCTG GACAGGGGCT
361 CGGCTGTTGG GCACTGACAA TTCCGTGGTG TTGTCGGGGA AATCATCGTC CTTTCCTTGG
421 CTGCTCGCCT GTGTTGCCAC CTGGATTCTG CGCGGGACGT CCTTCTGCTA CGTCCCTTCG
481 GCCCTCAATC CAGCGGACCT TCCTTCCCGC GGCCTGCTGC CGGCTCTGCG GCCTCTCCG
541 CGTCTTCGCC TTCGCCCTCA GACGAGTCGG ATCTCCCTTT GGGCCGCCTC CCC (SEQ ID
NO: 8) .
```

**[085]** В некоторых вариантах осуществления, последовательность, кодирующая WPRE, содержит последовательность нуклеиновой кислоты на 100% идентичную последовательности нуклеиновой кислоты:

```
1 ATCGATAATC AACCTCTGGA TTACAAAATT TGTGAAAGAT TGACTGGTAT TCTTAACTAT
61 GTTGCTCSTT TTACGSTATG TGGATACGCT GCTTTAATGC CTTTGATATCA TGCTATTGCT
121 TCCCGTATGG STTTCATTTT CTCCTCCTTG TATAAATCCT GGTGCTGTC TCTTTATGAG
181 GAGTTGTGGC CCGTTGTCAG GCAACGTGGC GTGGTGTGCA CTGTGTTTGC TGACGCAACC
241 CCCACTGGTT GGGGCATTGC CACCACCTGT CAGCTCCTTT CCGGGACTTT CGCTTTCCCC
301 CTCCTATTG CCACGGCGGA ACTCATCGCC GCCTGCCTTG CCCGCTGCTG GACAGGGGCT
361 CGGCTGTTGG GCACTGACAA TTCCGTGGTG TTGTCGGGGA AATCATCGTC CTTTCCTTGG
421 CTGCTCGCCT GTGTTGCCAC CTGGATTCTG CGCGGGACGT CCTTCTGCTA CGTCCCTTCG
481 GCCCTCAATC CAGCGGACCT TCCTTCCCGC GGCCTGCTGC CGGCTCTGCG GCCTCTCCG
541 CGTCTTCGCC TTCGCCCTCA GACGAGTCGG ATCTCCCTTT GGGCCGCCTC CCC (SEQ ID
NO: 8) .
```

**[086]** В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую BEST1, дополнительно содержит последовательность, кодирующую сигнал полиаденилирования (полиА). Сигнал полиА облегчает ядерный экспорт, усиливает трансляцию и увеличивает стабильность мРНК. В некоторых вариантах осуществления, последовательность, кодирующая сигнал полиА, содержит синтетическую или искусственную последовательность. В некоторых вариантах осуществления, последовательность, кодирующая сигнал полиА, содержит последовательность, выделенную или полученную из гена млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления, ген млекопитающего представляет собой ген человека. В некоторых вариантах осуществления, ген млекопитающего представляет собой ген бычьего гормона роста (BGH). В некоторых вариантах осуществления, последовательность, кодирующая сигнал полиА, содержит последовательность нуклеиновой кислоты по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности нуклеиновой кислоты:

```
1 CGCTGATCAG CCTCGACTGT GCCTTCTAGT TGCCAGCCAT CTGTTGTTTG CCCCTCCCC
61 GTGCCTTCCT TGACCCTGGA AGGTGCCACT CCCACTGTCC TTTCCТААТА AAATGAGGAA
121 АТТGСAТCGC АТТGТСТGAG TAGGTGTCAT TCTATTCTGG GGGGTGGGGT GGGGCAGGAC
181 AGCAAGGGGG AGGATTGGGA AGACAATAGC AGGCATGCTG GGGATGCGGT GGGCTCTATG
241 GCTTCTGAGG CGGAAAGAAC CAGCTGGGG (SEQ ID NO: 9).
```

**[087]** В некоторых вариантах осуществления, последовательность, кодирующая сигнал полиА, содержит последовательность нуклеиновой кислоты на 100% идентичную последовательности нуклеиновой кислоты:

```
1 CGCTGATCAG CCTCGACTGT GCCTTCTAGT TGCCAGCCAT CTGTTGTTTG CCCCTCCCC
61 GTGCCTTCCT TGACCCTGGA AGGTGCCACT CCCACTGTCC TTTCCТААТА AAATGAGGAA
121 АТТGСAТCGC АТТGТСТGAG TAGGTGTCAT TCTATTCTGG GGGGTGGGGT GGGGCAGGAC
181 AGCAAGGGGG AGGATTGGGA AGACAATAGC AGGCATGCTG GGGATGCGGT GGGCTCTATG
241 GCTTCTGAGG CGGAAAGAAC CAGCTGGGG (SEQ ID NO: 9).
```

### *Векторы ААВ*

**[088]** Вектор может содержать нуклеиновую кислоту, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую BEST1. В некоторых вариантах осуществления композиций в соответствии с настоящим изобретением, вектор может представлять собой вирусный вектор доставки. Вирусные векторы доставки в соответствии с настоящим изобретением могут содержать последовательности, необходимые для упаковки последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением в вирусную систему доставки для доставки в клетку-мишень или ткань-мишень. Типовые вирусные векторы доставки в соответствии с настоящим изобретением включают, но не ограничиваются ими, лентивирусные, ретровирусные или аденоассоциированные вирусные (ААВ) векторы.

**[089]** Вирусная система доставки ААВ согласно настоящему описанию может быть в форме зрелой частицы или вириона ААВ, то есть нуклеиновой кислоты, окруженной капсидом белка ААВ. В некоторых вариантах осуществления, вирусный вектор доставки ААВ может содержать геном ААВ или его производное.

**[090]** Геном ААВ представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует функции, необходимые для продуцирования частицы ААВ. Эти функции включают те, которые действуют в цикле репликации и упаковки ААВ в клетке-хозяине, включая инкапсулирование генома ААВ в частицу

ААВ. Встречающиеся в природе ААВ представляют собой репликационно-дефектные и те, которые полагаются на обеспечение вспомогательных функций в транс для завершения цикла репликации и упаковки. В предпочтительных вариантах осуществления геном ААВ вектора в соответствии с настоящим изобретением является репликационно-дефектным.

**[091]** Геном ААВ может быть в односпиральной форме, с положительным или отрицательным смыслом, или, альтернативно, в двухспиральной форме. Использование двухспиральной формы позволяет обойти стадию репликации ДНК в клетке-мишени и, таким образом, может ускорить экспрессию трансгена. Геном ААВ вектора в соответствии с настоящим изобретением может быть односпиральной формой.

**[092]** Геном ААВ может происходить из любого встречающегося в природе серотипа, изолята или клады ААВ. Таким образом, геном ААВ может быть полным геномом встречающегося в природе ААВ. Как известно специалисту в данной области техники, ААВ, встречающиеся в природе, можно классифицировать в соответствии с различными биологическими системами.

**[093]** ААВ упоминаются в соответствии с их серотипом. Серотип соответствует вариантному подвиду ААВ, который благодаря своему профилю экспрессии поверхностных антигенов капсида имеет отличительную реактивность, которая может использоваться для отличия его от других вариантных подвидов. Вирус, имеющий конкретный серотип ААВ, не может эффективно перекрестно реагировать с нейтрализующими антителами, специфичными для любого другого серотипа ААВ. Серотипы ААВ включают ААВ1, ААВ2, ААВ3, ААВ4, ААВ5, ААВ6, ААВ7, ААВ8, ААВ9, ААВ10 и ААВ11, а также рекомбинантные серотипы, такие как Rec2 и Rec3, недавно идентифицированные в мозге приматов. В настоящем изобретении может быть использован любой из этих серотипов ААВ. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, вектор ААВ в соответствии с настоящим изобретением может происходить из ААВ1, ААВ2, ААВ3, ААВ4, ААВ5, ААВ6, ААВ7, ААВ8, ААВ9, ААВ10, ААВ11, Rec2 или Rec3 ААВ.

**[094]** Обзоры серотипов ААВ можно найти в Choi et al. (2005) *Cur. Gene Ther.* 5: 299-310 и Wu et al. (2006) *Molecular Therapy* 14: 316-27. Последовательности геномов ААВ или элементов геномов ААВ, включая последовательности ITR, гены гер или сар, могут быть получены из следующих номеров доступа для всей геномной последовательности ААВ: Аденоассоциированный вирус 1 NC\_002077, AF063497; Аденоассоциированный вирус 2 NC\_001401; Аденоассоциированный вирус 3 NC\_001729; Аденоассоциированный вирус 3В NC\_001863; Аденоассоциированный вирус 4 NC\_001829; Аденоассоциированный вирус 5 Y18065, AF085716; Аденоассоциированный вирус 6 NC\_001862; Птиц ААВ ATCC VR-865 AY186198, AY629583, NC\_004828; Штамм ААВ птиц DA-1 NC\_006263, AY629583; Бычий ААВ NC\_005889, AY388617.

**[095]** ААВ также можно обозначать как клады или клоны. Это относится к филогенетическому родству ААВ естественного происхождения, а также к филогенетической группе ААВ, которая может быть прослежена до общего предка и содержит всех его потомков. Кроме того, ААВ могут быть обозначены как конкретный изолят, то есть генетический изолят определенного ААВ, встречающегося в природе. Термин генетический изолят описывает популяцию ААВ, которая подверглась ограниченному генетическому смешиванию с другими встречающимися в природе ААВ, тем самым определяя узнаваемую особую популяцию на генетическом уровне.

**[096]** Серотип ААВ определяет тканевую специфичность инфекции (или тропизм) вируса ААВ. Соответственно, предпочтительными серотипами ААВ для использования в ААВ, вводимых пациентам в

соответствии с настоящим изобретением, являются те, которые обладают естественным тропизмом или высокой эффективностью инфицирования клеток-мишеней внутри глаза. В одном варианте осуществления серотипы ААВ для использования в настоящем изобретении представляют собой серотипы, которые инфицируют клетки нейросенсорной части сетчатки, пигментного эпителия сетчатки и/или желтого пятна.

**[097]** Геном ААВ естественного серотипа, изолята или клады ААВ содержит по меньшей мере одну последовательность инвертированного концевой повтора (ITR). Последовательность ITR действует в цис-системе, обеспечивая функциональную точку начала репликации и позволяя интегрировать и вырезать вектор из генома клетки.

**[098]** Вирусный вектор доставки ААВ может включать по меньшей мере одну последовательность инвертированного концевой повтора (ITR), предпочтительно более одного ITR, например два ITR или более. Один или более ITR могут происходить из геномов ААВ, имеющих разные серотипы, или могут быть химерными или мутантными ITR. Предпочтительный мутант ITR представляет собой мутант с делецией *trs* (сайт концевой разрешения). Эта делеция позволяет продолжить репликацию генома для создания односпирального генома, который содержит как кодирующие, так и комплементарные последовательности, то есть самокомплементарный геном ААВ. Это позволяет обойти репликацию ДНК в клетке-мишени и, таким образом, обеспечивает ускоренную экспрессию трансгена.

**[099]** Включение одного или более ITR является предпочтительным, чтобы способствовать формированию конкатамера вирусного вектора доставки согласно настоящему изобретению в ядре клетки-хозяина, например, после превращения односпиральной векторной ДНК в двухспиральную ДНК под действием ДНК-полимеразы клетки-хозяина. Образование таких эписомальных конкатамеров защищает векторную конструкцию в течение жизни клетки-хозяина, тем самым обеспечивая пролонгированную экспрессию трансгена *in vivo*.

**[0100]** В некоторых вариантах осуществления, элементы ITR являются единственными последовательностями, сохраненными из природного генома ААВ в вирусном векторе доставки. Таким образом, В некоторых вариантах осуществления, вирусный вектор доставки не содержит гены *her* или *sar* нативного генома и, кроме того, не содержит каких-либо других последовательностей нативного генома. Это предпочтительно по причинам, описанным выше, а также для снижения возможности интеграции вектора в геном клетки-хозяина. Кроме того, уменьшение размера генома ААВ позволяет увеличить гибкость при включении других элементов последовательности (таких как регуляторные элементы) в вектор в дополнение к трансгену. В некоторых вариантах осуществления, вирусный вектор доставки в соответствии с настоящим изобретением содержит последовательности, кодирующие ITR ААВ2. В некоторых вариантах осуществления, последовательности, кодирующие два ITR ААВ2, могут содержать или состоять из последовательности нуклеиновой кислоты:

```
1 ctgctgctctc gctctctcac tgaggccgccc cgggcaaagc cggggcgtcg ggcgaccttt
61 ggtctgccccg cctcagtgag cgagcgagcg cgagagagg gagtggccaa ctccatcact
121 aggggttccct tgtagttaat gatt (SEQ ID NO: 10).
```

и/или

```
1 tgcgctctcg ctctctcact gaggccgggc gaccaaaggc cggccgacgc cggggctttg
61 cccgggctggc ctctctcact gagcgagcgc gcagagcttt ttgcaaaagc ctaggcctcc
121 aaaaaagcct cctcactact tctgg (SEQ ID NO: 11).
```

**[0101]** Геном ААВ может содержать последовательность нуклеиновой кислоты длиной около 4,7 т.п.н. Таким образом, в тех вариантах осуществления, где последовательность нуклеиновой кислоты, которая должна быть доставлена вирусным вектором ААВ, имеет длину менее 4,7 т.п.н., можно использовать спейсерную или филлерную последовательность. В некоторых вариантах осуществления, присутствие спейсерной последовательности может способствовать упаковке вирусного вектора ААВ в вирусную частицу. В некоторых вариантах осуществления, спейсерная последовательность содержит случайную последовательность. Типовая спейсерная последовательность в соответствии с настоящим изобретением может содержать или состоять из последовательности нуклеиновой кислоты:

```

1  GATGTAACCA TATACTTAGG CTGGATCTTC TCCC GCGAAT TTAAACCCTC ACCAACTACG
61  AGATATGAGG TAAGCCAAAA AAGCACGTAG TGGCGCTCTC CGACTGTTCC CAAATTGTAA
121  CTTATCGTTC CGTGAAGGCC AGAGTTACTT CCCGGCCCTT TCCATGCGCG CACCATACCC
181  TCCTAGTTCC CCGGTTATCT TTCCGAAGTG GGAGTGAGCG AACCTCCGTT TACGTCTTGT
241  TACCAATGAT GTAGCTATGC ACTTTGTACA GGGTGCCAAC GGGTTTCA CA ATTACAGAT
301  AGTGGGGATC CCGGCAAAGG GCCTATATTT GCGGTCCAAC TTAGGCGTAA ACCTCGATGC
361  TACСТАCTCA GACCCACCTC GCGCGGGGTA AATAAGGCAC TCATCCCAGC TGGTTCTTGG
421  CGTTCTACGC AGCGACATGT TTATTAACAG TTGTCTGGCA GCACAAAACT TTTACCATGG
481  TCGTAGAAGC CCCCCAGAGT TAGTTCATAC СТААТGCCAC AAATGTGACA GGACGCCGAT
541  GGGTACCGGA CTTTAGGTCG AGCACAGTTC GGTAACGGAG AGACCCTGCG GCGTACTTCA
601  TTATGTATAT GGAACGTGCC CAAGTGACGC CAGGCAAGTC TCAGCTGGTT CCTGTGTTAG
661  CTCGAGGGTA GACATACGAG CTGATTGAAC ATGGGTTGGG GGCCTCGAAC CGTCGAGGAC
721  CCCATAGTAC CTCGGAGACC AAGTAGGGCA GCCTATAGTT TGAAGCAGAA СТАТТTCGGG
781  GGGCGAGCCC TCATCGTCTC TTCTGCGGAT GACTCAACAC GCTAGGGACG TGAAGTCGAT
841  TCSTTCGATG GTTATAAATC AAAGACTCAG AGTGCTGTCT GGAGCGTGAA TCTAACGGTA
901  CGTATCTCGA TTGCTCGGTC GCTTTTCGCA CTCCGCGAAA GTTCGTACCG CTCATTCACT
961  AGGTTGCGAA GCCTATGCTG ATATATGAAT CCAAAC TAGA GCAGGGCTCT TAAGATTCGG
1021  AGTTGTAAAT ACTTAATACT CCAATCGGCT TTTACGTGCA CCACCGCGGG CGGCTGACAA
1081  GGGTCTCACA TCGAGAAACA AGACAGTTCC GGGCTGGAAG TAGCGCCGGC TAAGGAAGAC
1141  GCCTGGTACG GCAGGACTAT GAAACCAGTA CAAAGGCAAC ATCCTCACTT GGGTGAACGG
1201  AAACGCAGTA TTATGGTTAC TTTTTGGATA CGTGAAACAT ATCCCATGGT AGTCCTTAGA
1261  CTTGGGAGTC TATCACCCCT AGGGCCATA TCTGGAAATA GACGCCAGGT TGAATCCGTA
1321  TTTGGAGGTA CGATGGAACA GTCTGGGTGG GACGTGCTTC ATTTATACCC TGCGCAGGCT
1381  GGACCGAGGA CCGCAAGGTG CGGCGGTGCA CAAGCAATTG ACAACTAACC ACCGTGTATT
1441  CATTATGGTA CCAGGAАСТТ TAAGCCGAGT CAATGAAGCT CGCATTACAG TGTTTACCGC
1501  ATCTTGCCGT TACTCАААА СТGTGATCCA CCACAAGTCA AGCCATTGCC TCTCTGACAC
1561  GCCGTAAGAA TTAATATGTA AACTTTGCGC GGGTTGACTG CGATCCGTTT AGTCTCGTCC
1621  GAGGGCААА TCCTATTCCC ATTTGTATGT TCAGCTAACT TCTACCCATC CCCC GAAGTT
1681  AAGTAGGTCG TGAGATGCCA TGGAGGCTCT CGTTCATCCC GTGGGACATC AAGCTTCCC
1741  TTGATAAAGC ACCCCGCTCG GGTGTAGCAG AGAAGACGCC TTCTGAATTG TGCAATCCCT
1801  CCACCTTATC TAAGCTTGCT ACCAATAATT AGCATTTTTG CCTTGCGACA GACCTCCTAC
1861  TTAGATTGCC ACACATTGAG CTAGTCAGTG AGCGATAAGC TTGACGCGCT TTCAAGGGTC
1921  GCGAGTACGT GAACTAAGGC TCCGGACAGG АСТАТААСТ TGGGTTTGAT CTCGCCCCGA
1981  CAACTGCAAA CCTCAACTTT TTTAGATTAT ATGGTTAGCC GAAGTTGCAC GAGGTGGCGT

```

2041 CCGCGGACTG STCCCCGAGT GTGGCTCTTT CATCTGACAA CGTGCAACCC STATCGCGGC  
2101 CGATTGTTTC TGCGGACGAT GTTGTCTCA TAGTTTGGGC ATGTTTCCCT TGTAGGTGTG  
2161 AAACCACTTA GCTTCGCGCC GTAGTCCCAA TGAAAAACCT ATGGACTTTG TTTTGGGTAG  
2221 CACCAGGAAT CTGAACCGTG TGAATGTGGA CGTCGCGCGC GTAGACCTTT ATCTCCGGTT  
2281 CAAGCTAGGG ATGTGGCTGC ATGCTACGTT GTCACACCTA CACTGCTCGA AGTAAATATG  
2341 CGAAGCGCGC GGCCTGGCCG GAGGCGTTCC GCGCCGCCAC GTGTTCTGTTA ACTGTTGATT  
2401 GGTGGCACAT AAGCAATATC GTAGTCCGTC AAATTCAGCT CTGTTATCCC GGGCGTTATG  
2461 TGTCAAATGG CGTAGAACGG GATTGACTGT TTGACGGTAG (SEQ ID NO: 12).

**[0102]** В некоторых вариантах осуществления, вирусный вектор доставки ААВ содержит последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую последовательность, кодирующую промотор VMD2, последовательность, кодирующую белок BEST1, и последовательность, кодирующую WPRE. Типовой вирусный вектор доставки ААВ согласно настоящему описанию, содержащий данную последовательность нуклеиновой кислоты (VMD2.BEST1.WPRE.pA), содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты:

1 TAGCTGCGCG STCGCTCGCT CACTGAGGCC GCCCGGGCAA AGCCCGGGCG TCGGGCGACC  
61 TTTGGTTCGCC CGGCCTCAGT GAGCGAGCGA GCGCGCAGAG AGGGAGTGGC CAACTCCATC  
121 АСТАГГГГТТ ССТТГТАГТТ ААТГАТТААС ССГССАТГСТ АСТТАТСТАС ГТАГССАТГС  
181 ТСТАГГТААА ТТСТГТСАТТ ТТАСТАГГГТ ГАТГАААТТС ССААГСААСА ССАТСТТТТТ  
241 САГАТАААГГГ САСТГААГГСТ ГАГАГААГГГА СТГАААССТА СССГГГГТСА ССАСАСАСАГ  
301 ГТГГСАААГГС ТГГГАССАГА ААССААГГАСТ ГТТГАСТГСА ГСССГГТАТТ САТТСТТТСС  
361 АТАГСССАСА ГГГСТГТСАА АГАССССАГГ ГССТАГТСАГ АГГСТССТСС ТТСТТГГАГА  
421 ГТТСТТГГСА САГААГТТГА АГСТСАГСАС АГССССТАА ССССААСТС ТСТТГСААГ  
481 ГССТСААГГГ ТСАГААСАСТ ГГТГГАГСАГ АТСТТТАГС СТСТГГАТТТ ТААГГССАТГ  
541 ГТАГААГГГГ ТГТТГСССТА ААТТССАГСС СТГГТСТСАГ СССААСАСС ТССААГААГА  
601 ААТТАГААГГ ГССАТГГССА ГГСТГТГСТА ГССГТТГСТТ СТГАГСАГАТ ТАСААГААГГ  
661 ГАСТААГСА ААГАСТССТТ ТГТГГААГГТС СТГГСТТААГ ГАТСАААГТ АСГГССГГСТС  
721 АГСАСТСАСГ ТГГГСАГТГС САГСТСТАА ГАТТГГГСАГ ГГГСАСТГГС САСАГАТТСС  
781 САААГГАТСС САССАГССТА ГТССССАГС СГГСАССАТГ АССАТСАСТТ АСАСААГССА  
841 АГТГГСТААТ ГСССГСТТАГ ГТСТСТТСТС ССГССТГСТГ СТГТГСТГГС ГГГГСАГАТ  
901 СТАСААГСТГ СТАТАТГГСГ АГТТСТТААТ СТТСТТГСТС ТГСТАСТАСА ТСАТССГСТТ  
961 ТАТТТАТААГ СТГГСССТСА ССГААГААСА АСАГСТГАТГ ТТТГААААС ТАСТСТГТА  
1021 ТТГСАСАСАГ ТАСАТССАГС ТСАТССССАТ ТТСТТТСАГТ СТГГГСТТСТ АСГТГАСАГСТ  
1081 ГГТСАТГАСС ССГТГГТГГА АССАГТАСА ГААССТГССГ ТГГСССГАСС ГССТСАТГАГ  
1141 ССТГГТГТСГ ГГСТТСГТСГ ААГГСАААГГА САГАСАААГГ ССГСТГСТГС ГГСАСАСАГСТ  
1201 САТССГСТАС ГССААССТГГ ГСААСГТГСТ САТСТТГСАГ АСГТСАСА ССГСАГТСТА  
1261 СААГСАСТТС СССАГСАССС АССАСТТГТ ГСААГСААГГ ТТТАТГАСТС ССГСАААСА  
1321 СААГСАСТТГ ГАГАААСТГА ГССТААССА СААСАТГТТС ТГГГТГСССТ ГГГТГТГГТТ  
1381 ТГССААССТГ ТСААТГАААГ ССГТГГСТТГГ ААГТСАААТС ССГГАСССТА ТСТТГСТССА  
1441 ГАССТТГСТГ ААСАГАТГА АСАСТТГСА ТАСТСАГТГТ ГСАСАСТТГ АТГССТАСА  
1501 СТГГАТТАГТ АТСССАСТГГ ТГАТАСАСА ГГТГГТГАСТ ГТГГСАГТГ АСАСТТСТТ  
1561 ССТГАСТТГТ СТАГТТГГГС ГСАГТТТСТ ГААСССАГСС ААГССТТАС СТГГССАТГА

1621 GCTGGACCTC GTTGTGCCCG TCTTCACGTT CCTGCAGTTC TTCTTCTATG TTGGCTGGCT  
1681 GAAGGTGGCA GAGCAGCTCA TCAACCCCTT TGGAGAGGAT GATGATGATT TTGAGACCAA  
1741 CTGGATTGTC GACAGGAATT TGCAGGTGTC CCTGTTGGCT GTGGATGAGA TGCACCAGGA  
1801 CCTGCCTCGG ATGGAGCCGG ACATGTACTG GAATAAGCCC GAGCCACAGC CCCCTACAC  
1861 AGCTGCTTCC GCCCAGTTCC GTCGAGCCTC CTTTATGGGC TCCACCTTCA ACATCAGCCT  
1921 GAACAAAGAG GAGATGGAGT TCCAGCCCAA TCAGGAGGAC GAGGAGGATG CTCACGCTGG  
1981 CATCATTGGC CGCTTCCTAG GCCTGCAGTC CCATGATCAC CATCTCCCA GGGCAAATC  
2041 AAGGACCAAA CTA CTACTGTGGC CCAAGAGGGA ATCCCTTCTC CACGAGGGCC TGCCCAAAAA  
2101 CCACAAGGCA GCCAAACAGA ACGTTAGGGG CCAGGAAGAC AACAAAGCCT GGAAGCTTAA  
2161 GGCTGTGGAC GCCTTCAAGT CTGCCCCACT GTATCAGAGG CCAGGCTACT ACAGTGCCCC  
2221 ACAGACGCC CT CAGCCCCA CTCCCATGTT CTTCCCCCTA GAACCATCAG CGCCGTCAA  
2281 GCTTACAGT GTCACAGGCA TAGACACCAA AGACAAAAGC TTAAAGACTG TGAGTTCTGG  
2341 GGCCAAGAAA AGTTTTGAAT TGCTCTCAGA GAGCGATGGG GCCTTGATGG AGCACCCAGA  
2401 AGTATCTCAA GTGAGGAGGA AA ACTGTGGA GTTTAACCTG ACGGATATGC CAGAGATCCC  
2461 CGAAAATCAC CTCAAAGAAC CTTTGAACA ATCACCACC AACATACACA CTACACTCAA  
2521 AGATCACATG GATCCTTATT GGGCCTTGA AAACAGGGAT GAAGCACATT CCTAATCTAG  
2581 CGGCCGCGAA TTCGATATCA AGCTTATCGA TAATCAACCT CTGGATTACA AAATTTGTGA  
2641 AAGATTGACT GGTATTCTTA ACTATGTTGC TCCTTTTACG CTATGTGGAT ACGCTGCTTT  
2701 AATGCCTTTG TATCATGCTA TTGCTTCCCG TATGGCTTTC ATTTTCTCCT CCTTGTATAA  
2761 ATCCTGGTTG CTGTCTCTTT ATGAGGAGTT GTGGCCCGTT GTCAGGCAAC GTGGCGTGGT  
2821 GTGCACTGTG TTTGCTGACG CAACCCCCAC TGGTTGGGGC ATTGCCACCA CCTGTCAGCT  
2881 CCTTCCGGG ACTTTCGCTT TCCCCCTCCC TATTGCCACG GCGGAACTCA TCGCCGCTG  
2941 CCTTGCCCGC TGCTGGACAG GGGCTCGGCT GTTGGGCACT GACAATTCCG TGGTGTGTC  
3001 GGGGAAATCA TCGTCCTTTC CTTGGCTGCT CGCCTGTGTT GCCACCTGGA TTCTGCGCGG  
3061 GACGTCTTTC TGCTACGTCC CTTGCGCCCT CAATCCAGCG GACCTTCTT CCCGCGCCT  
3121 GCTGCCGGCT CTGCGGCCTC TTCCGCTCT TCGCCTTCGC CCTCAGACGA GTCGGATCTC  
3181 CCTTGGGGC GCCTCCCCGG CGGCCGCGCA CCGTCGACTC GCTGATCAGC CTCGACTGTG  
3241 CCTTCTAGTT GCCAGCCATC TGTTGTTTGC CCCTCCCCCG TGCCCTCCTT GACCCTGGAA  
3301 GGTGCCACTC CCACTGTCCT TTCCTAATAA AATGAGGAAA TTGCATCGCA TTGTCTGAGT  
3361 AGGTGTCATT CTATTCTGGG GGGTGGGGTG GGGCAGGACA GCAAGGGGGA GGATTGGGAA  
3421 GACAATAGCA GGCATGCTGG GGATGCGGTG GGCTCTATGG CTTCTGAGGC GGAAAGAACC  
3481 AGCTGGGGCT CGACTAGAGC ATGGCTACGT AGATAAGTAG CATGGCGGGT TAATCATTA  
3541 CTACAAGGAA CCCCTAGTGA TGGAGTTGGC CACTCCCTCT CTGCGGCTC GCTCGCTCAC  
3601 TGAGGCCGGG CGACCAAAGG TCGCCCGACG CCCGGGCGGC CTCAGTGAGC GAGCGAGCGC  
3661 GCAGAGCTTT TTGCAAAAGC CTAGGCCTCC AAAAAAGCCT CCTCACTACT TCTGGAATAG  
3721 CTCAGAGGCC GAGGCGGCCT CGGCCTCTGC ATAAATAAAA AAAATTAGTC AGCCATGGGG  
3781 CGGAGAATGG GCGGAACTGG GCGGAGTTAG GGGCGGGATG GCGGAGTTA GGGGCGGGAC  
3841 TATGGTTGCT GACTAATTGA GATGCATGCT TTGCATACTT CTGCCTGCTG GGGAGCCTGG  
3901 GGACTTTCCA CACCTGGTTG CTGACTAATT GAGATGCATG CTTTGCATAC TTCTGCCTGC  
3961 TGGGGAGCCT GGGGACTTTC CACACCCTAA CTGACACACA TTCCACAGCT GCATTAATGA  
4021 ATCGGCCAAC GCGCGGGGAG AGGCGGTTTG CGTATTGGGC GCTCTTCCGC TTCTCGCTC  
4081 ACTGACTCGC TCGCTCGGT CGTTGCGCTG CGGCGAGCGG TATCAGCTCA CTCAAAGGCG  
4141 GTAATACGGT TATCCACAGA ATCAGGGGAT AACCGAGGAA AGAACATGTG AGCAAAAGGC

4201 CAGCAAAGG CCAGGAACCG TAAAAAGGCC GCGTTGCTGG CGTTTTTCCA TAGGCTCCGC  
4261 CCCCCTGACG AGCATCACAA AAATCGACGC TCAAGTCAGA GGTGGCGAAA CCCGACAGGA  
4321 CTATAAAGAT ACCAGGCGTT TCCCCCTGGA AGCTCCCTCG TCGCTCTCC TGTTCGACC  
4381 CTGCCGCTTA CCGGATACCT GTCCGCTTT CTCCCTTCGG GAAGCGTGGC GCTTCTCAT  
4441 AGCTCACGCT GTAGGTATCT CAGTTCGGTG TAGGTCGTTC GCTCCAAGCT GGGCTGTGTG  
4501 CACGAACCC CCGTTCAGCC CGACCGCTGC GCCTTATCCG GTAACATATCG TCTTGAGTCC  
4561 AACCCGGTAA GACACGACTT ATCGCCACTG GCAGCAGCCA CTGGTAACAG GATTAGCAGA  
4621 GCGAGGTATG TAGGCGGTGC TACAGAGTTC TTGAAGTGGT GGCCTAACTA CGGCTACACT  
4681 AGAAGAACAG TATTTGGTAT CTGCGCTCTG CTGAAGCCAG TTACCTTCGG AAAAAAGATT  
4741 GGTAGCTCTT GATCCGGCAA ACAAACCACC GCTGGTAGCG GTGGTTTTTT TGTTTGCAAG  
4801 CAGCAGATTA CGCGCAGAAA AAAAGGATCT CAAGAAGATC CTTTGATCTT TTCTACGGGG  
4861 TCTGACGCTC AGTGGAACGA AAACCTACGT TAAGGGATTT TGGTCATGAG ATTATCAAAA  
4921 AGGATCTTCA CCTAGATCCT TTTAAATTAA AAATGAAGTT TTAAATCAAT CTAAAGTATA  
4981 TATGAGTAAA CTTGGTCTGA CAGTTACCAA TGCTTAATCA GTGAGGCACC TATCTCAGCG  
5041 ATCTGTCTAT TTCGTTTATC CATAGTTGCC TGAATCCTGC AAACCACGTT GTGTCTCAAA  
5101 ATCTCTGATG TTACATTGCA CAAGATAAAA ATATATCATC ATGAACAATA AAACGTCTG  
5161 CTTACATAAA CAGTAATACA AGGGGTGTTA TGAGCCATAT TCAACGGGAA ACGTCTTGCT  
5221 CGAGGCCGCG ATTAATTTCC AACATGGATG CTGATTTATA TGGGTATAAA TGGGCTCGCG  
5281 ATAATGTCGG GCAATCAGGT GCGACAATCT ATCGATTGTA TGGGAAGCCC GATGCGCCAG  
5341 AGTTGTTTCT GAAACATGGC AAAGGTAGCG TTGCCAATGA TGTACAGAT GAGATGGTCA  
5401 GACTAAACTG GCTGACGGAA TTTATGCCTC TTCCGACCAT CAAGCATTTT ATCCGTACTC  
5461 CTGATGATGC ATGGTTACTC ACCACTGCGA TCCCCGGGAA AACAGCATTC CAGGTATTAG  
5521 AAGAATATCC TGATTCAGGT GAAAATATTG TTGATGCGCT GGCAGTGTTT CTGCGCCGGT  
5581 TGCATTGAT TCCTGTTTGT AATTGTCCTT TTAACAGCGA TCGCGTATTT CGTCTCGCTC  
5641 AGGCGCAATC ACGAATGAAT AACGGTTTGG TTGATGCGAG TGATTTTGAT GACGAGCGTA  
5701 ATGGCTGGCC TGTTGAACAA GTCTGGAAAG AAATGCATAA GCTTTTGCCA TTCTCACCGG  
5761 ATTCAGTCGT CACTCATGGT GATTTCTCAC TTGATAACCT TATTTTTGAC GAGGGGAAAT  
5821 TAATAGGTTG TATTGATGTT GGACGAGTCG GAATCGCAGA CCGATACCAG GATCTTGCCA  
5881 TCCTATGGAA CTGCCTCGGT GAGTTTTCTC CTTTATTACA GAAACGGCTT TTTCAAAAAT  
5941 ATGGTATTGA TAATCCTGAT ATGAATAAAT TGCAGTTTCA TTTGATGCTC GATGAGTTTT  
6001 TCTAAGGGCG GCCTGCCACC ATACCCACGC CGAAACAAGC GCTCATGAGC CCGAAGTGGC  
6061 GAGCCCGATC TTCCCACATG GTGATGTCGG CGATATAGGC GCCAGCAACC GCACCTGTGG  
6121 CGCCGGTGAT GCCGGCCACG ATGCGTCCGG CGTAGAGGAT CTGGCTAGCG ATGACCCTGC  
6181 TGATTGGTTC GCTGACCATT TCCGGGTGCG GGACGGCGTT ACCAGAAACT CAGAAGGTTT  
6241 GTCCAACCAA ACCGACTCTG ACGGCAGTTT ACGAGAGAGA TGATAGGGTC TGCTTCAGGG  
6301 TGACCGATGT AACCATATAC TTAGGCTGGA TCTTCTCCCG CGAATTTTAA CCCTCACCAA  
6361 CTACGAGATA TGAGGTAAGC CAAAAAGCA CGTAGTGGCG CTCTCCGACT GTTCCCAAAT  
6421 TGTAACCTAT CGTTCCTGTA AGGCCAGAGT TACTTCCCGG CCCTTTCCAT GCGCGACCA  
6481 TACCCTCCTA GTTCCCGGT TATCTTTCCG AAGTGGGAGT GAGCGAACCT CCGTTTACGT  
6541 CTTGTTACCA ATGATGTAGC TATGCACTTT GTACAGGGTG CCAACGGGTT TCACAATTCA  
6601 CAGATAGTGG GGATCCCGGC AAAGGGCCTA TATTTGCGGT CCAACTTAGG CGTAAACCTC  
6661 GATGCTACCT ACTCAGACCC ACCTCGCGCG GGGTAAATAA GGCACATCAT CCAGCTGGTT  
6721 CTTGGCGTTC TACGCAGCGA CATGTTTATT AACAGTTGTC TGGCAGCACA AAACTTTTAC

6781 CATGGTCGTA GAAGCCCCC AGAGTTAGTT CATACTAAT GCCACAAATG TGACAGGACG  
6841 CCGATGGGTA CCGGACTTTA GGTTCGAGCAC AGTTCGGTAA CGGAGAGACC CTGCGGCGTA  
6901 CTTCAATTATG TATATGGAAC GTGCCCAAGT GACGCCAGGC AAGTCTCAGC TGGTTCCTGT  
6961 GTTAGCTCGA GGGTAGACAT ACGAGCTGAT TGAACATGGG TTGGGGGCCT CGAACCGTCG  
7021 AGGACCCCAT AGTACCTCGG AGACCAAGTA GGGCAGCCTA TAGTTTGAAG CAGAACTATT  
7081 TCGGGGGGCG AGCCCTCATC GTCTCTTCTG CGGATGACTC AACACGCTAG GGACGTGAAG  
7141 TCGATTCCCTT CGATGGTTAT AAATCAAAGA CTCAGAGTGC TGTCTGGAGC GTGAATCTAA  
7201 CGGTACGTAT CTCGATTGCT CGGTGCGTTT TCGCACTCCG CGAAAGTTCG TACCGCTCAT  
7261 TCACTAGGTT GCGAAGCCTA TGCTGATATA TGAATCCAAA CTAGAGCAGG GCTCTTAAGA  
7321 TTCGGAGTTG TAAATACTTA ATACTCCAAT CGGCTTTTAC GTGCACCACC GCGGGCGGCT  
7381 GACAAGGGTC TCACATCGAG AAACAAGACA GTTCCGGGCT GGAAGTAGCG CCGGCTAAGG  
7441 AAGACGCCTG GTACGGCAGG ACTATGAAAC CAGTACAAAG GCAACATCCT CACTTGGGTG  
7501 AACGGAAACG CAGTATTATG GTTACTTTTT GGATACGTGA AACATATCCC ATGGTAGTCC  
7561 TTAGACTTGG GAGTCTATCA CCCCTAGGGC CCATATCTGG AAATAGACGC CAGGTTGAAT  
7621 CCGTATTTGG AGGTACGATG GAACAGTCTG GGTGGGACGT GCTTCATTTA TACCCTGCGC  
7681 AGGCTGGACC GAGGACCGCA AGGTGCGGCG GTGCACAAGC AATTGACAAC TAACCACCGT  
7741 GTATTCATTA TGGTACCAGG AACTTTAAGC CGAGTCAATG AAGCTCGCAT TACAGTGTTT  
7801 ACCGCATCTT GCCGTTACTC ACAAAGTGTG ATCCACCACA AGTCAAGCCA TTGCCTCTCT  
7861 GACACGCCGT AAGAATTAAT ATGTAAACTT TGCGCGGGTT GACTGCGATC CGTTCAGTCT  
7921 CGTCCGAGGG CACAATCCTA TTCCCATTG TATGTTGAGC TAACTTCTAC CCATCCCCCG  
7981 AAGTTAAGTA GGTTCGTGAGA TGCCATGGAG GCTCTCGTTC ATCCCGTGGG ACATCAAGCT  
8041 TCCCCTTGAT AAAGCACCCC GCTCGGGTGT AGCAGAGAAG ACGCCTTCTG AATTGTGCAA  
8101 TCCCTCCACC TTATCTAAGC TTGCTACCAA TAATTAGCAT TTTTGCCTTG CGACAGACCT  
8161 CCTACTTAGA TTGCCACACA TTGAGCTAGT CAGTGAGCGA TAAGCTTGAC GCGCTTTCAA  
8221 GGGTCGCGAG TACGTGAACT AAGGCTCCGG ACAGGACTAT ATACTTGGGT TTGATCTCGC  
8281 CCCGACAACT GCAAACCTCA ACTTTTTTAG ATTATATGGT TAGCCGAAGT TGCACGAGGT  
8341 GCGTCCGCG GACTGCTCCC CGAGTGTGGC TCTTTCATCT GACAACGTGC AACCCCTATC  
8401 GCGGCCGATT GTTTCTGCGG ACGATGTTGT CCTCATAGTT TGGGCATGTT TCCCTTGTAG  
8461 GTGTGAAACC ACTTAGCTTC GCGCCGTAGT CCCAATGAAA AACCTATGGA CTTTGTTTTG  
8521 GGTAGCACCA GGAATCTGAA CCGTGTGAAT GTGGACGTCG CGCGCGTAGA CCTTTATCTC  
8581 CGGTTCAAGC TAGGGATGTG GCTGCATGCT ACGTTGTCAC ACCTACACTG CTCGAAGTAA  
8641 ATATGCGAAG CGCGCGGCCT GGCCGGAGGC GTTCCGCGCC GCCACGTGTT CGTTAACTGT  
8701 TGATTGGTGG CACATAAGCA ATATCGTAGT CCGTCAAATT CAGCTCTGTT ATCCGGGCGG  
8761 TTATGTGTCA AATGGCGTAG AACGGGATTG ACTGTTTGAC GGTAGGGTGA CCTAAGCCAG  
8821 ATGCTACACA ATTAGGCTTG TACATATTGT CGTTAGAACG CGGCTACAAT TAATACATAA  
8881 CCTTATGTAT CATAACATA CGATTTAGGT GACACTATAG AATACACGGA ATTAATTC (SEQ

ID NO: 13).

**[0103] Таблица 1. Особенности плазмидной последовательности VMD2.BEST1.WPRE.pA**

Название	Тип	Минимум	Максимум	Длина	Направлени е
----------	-----	---------	----------	-------	-----------------

130bp AAB2 5'ITR	LTR	4	133	130	прямое
Промотор VMD2	промотор	189	811	623	прямое
Козак	Козак	812	821	10	прямое
BEST1	CDS	818	2 575	1 758	прямое
WPRE	WPRE	2 606	3 198	593	прямое
bGH pA	полиА_сигнал	3 220	3 488	269	прямое
112bp AAB2 3'ITR	LTR	3 546	3 657	112	обратное
pBR322 rep происхождение	rep_происхождение	4 230	4 849	620	обратное
AphR (KanR)	CDS	5 190	6 005	816	прямое
Случайно сгенерированная спейсерная последовательность	Спейсер	6 306	8 805	2 500	отсутствует

**[0104]** В некоторых вариантах осуществления, вирусный вектор доставки ААВ содержит последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую последовательность, кодирующую промотор VMD2, последовательность, кодирующую белок BEST1, последовательность, кодирующую интрон, последовательность, кодирующую экзон, и последовательность, кодирующую WPRE. Типовой вирусный вектор доставки ААВ в соответствии с настоящим изобретением содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую последовательность VMD2.IntEx.BEST1.WPRE.pA, содержащую или состоящую из последовательности нуклеиновой кислоты:

```

1 TAGCTGCGCG CTCGCTCGCT CACTGAGGCC GCCCGGGCAA AGCCCGGGCG TCGGGCGACC
61 TTTGGTTCGCC CGGCCTCAGT GAGCGAGCGA GCGCGCAGAG AGGGAGTGGC CAACTCCATC
121 АСТАGGGGTT CСТТGТАGТТ ААТGАТТААС ССGССАТGСТ АСТТАТСТАС GTAGCCATGC
181 ТСТАGGТААА ТТСТGTСАТТ ТТАСТАGGGT GATGAAATTC CCAAGCAACA CCATCCTTTT
241 СAGАТАAGGG СACTGAGGCT GAGAGAGGAG СТGAAACCTA CCCGGGGTCA CCACACACAG
301 GTGGCAAGGC TGGGACCAGA AACCAGGACT GTTGACTGCA GCCCGGTATT CATTCSTTCC
361 АТАGСССАСА GGGCTGTCAA AGACCCСAGG GCCTAGTCAG AGGCTCCTCC TTCSTGGAGA
421 GTTCSTGGCA CAGAAGTTGA AGCTCAGCAC AGCCCCCTAA CCCCАACTC TCTCTGCAAG
481 GCCTCAGGGG TCAGAАСACT GGTGGAGCAG ATCCTTTAGC CTCTGGATTT TAGGGCCATG
541 GTAGAGGGGG TGTTGCCCTA ААТТССAGCC СТGGТСТСAG СССААСАССС ТССАAGАAGА
601 ААТТАGAGGG GCCATGGCCA GGCTGTGCTA GCCGTTGCTT CTGAGCAGAT TACAAGAAGG
661 GACTAAGACA AGGACTCCTT TGTGGAGGTC CTGGCTTAGG GAGTCAAGTG ACGGCGGCTC
721 AGCACTCACG TGGGCAGTGC CAGCCTCTAA GAGTGGGCAG GGGCACTGGC CACAGAGTCC
781 СAGGGAGTCC СACCAGCCTA GTCGCCAGAC CGGGTGCCGC AGGGGGACGG CTGCCTTCGG
841 GGGGGACGGG GCAGGGCGGG GTTCGGCTTC TGGCGTGTGA CCGGCGGCTC TAGAGCCTCT
901 GCTAACCATG TTCATGCSTT CTTCTTTTTC CTACAGCTCC TGGGCAACGT GCTGGTTATT
961 GTGCTGTCTC ATCATTTTGG СAAAGAAТТG GCACCATGAC CATCACTTAC АСАAGССАAG
1021 TGGCTAATGC СCGCTTAGGC TCCTTCTCCC GCCTGCTGCT GTGCTGGCGG GGCAGCATCT

```

1081 ACAAGCTGCT ATATGGCGAG TTCTTAATCT TCCTGCTCTG CTACTIONATC ATCCGCTTTA  
1141 TTTATAGGCT GGCCCTCACG GAAGAACAAC AGCTGATGTT TGAGAAACTG ACTCTGTATT  
1201 GCGACAGCTA CATCCAGCTC ATCCCCATTT CCTTCGTGCT GGGCTTCTAC GTGACGCTGG  
1261 TCGTGACCCG CTGGTGGAAC CAGTACGAGA ACCTGCCGTG GCCCGACCGC CTCATGAGCC  
1321 TGGTGTCCGG CTTCGTGAA GGCAAGGACG AGCAAGGCCG GCTGCTGCGG CGCACGCTCA  
1381 TCCGCTACGC CAACCTGGGC AACGTGCTCA TCCTGCGCAG CGTCAGCACC GCAGTCTACA  
1441 AGCGCTTCCC CAGCGCCCAG CACCTGGTGC AAGCAGGCTT TATGACTCCG GCAGAACACA  
1501 AGCAGTTGGA GAAACTGAGC CTACCACACA ACATGTTCTG GGTGCCCTGG GTGTGGTTTG  
1561 CCAACCTGTC AATGAAGGCG TGGCTTGGAG GTCGAATCCG GGACCCTATC CTGCTCCAGA  
1621 GCCTGCTGAA CGAGATGAAC ACCTTGCGTA CTCAGTGTGG ACACCTGTAT GCCTACGACT  
1681 GGATTAGTAT CCCACTGGTG TATACACAGG TGGTACTGTG GCGGTGTAC AGCTTCTTCC  
1741 TGACTTGTCT AGTTGGGCGG CAGTTTCTGA ACCCAGCCAA GGCCTACCCCT GGCCATGAGC  
1801 TGGACCTCGT TGTGCCCGTC TTCACGTTCC TGCAGTTCTT CTTCTATGTT GGCTGGCTGA  
1861 AGGTGGCAGA GCAGCTCATC AACCCCTTTG GAGAGGATGA TGATGATTTT GAGACCAACT  
1921 GGATTGTCGA CAGGAATTTG CAGGTGTCCC TGTTGGCTGT GGATGAGATG CACCAGGACC  
1981 TGCCTCGGAT GGAGCCGGAC ATGTACTGGA ATAAGCCCGA GCCACAGCCC CCCTACACAG  
2041 CTGCTTCCGC CCAGTTCCGT CGAGCCTCCT TTATGGGCTC CACCTTCAAC ATCAGCCTGA  
2101 ACAAGAGGA GATGGAGTTC CAGCCCAATC AGGAGGACGA GGAGGATGCT CACGCTGGCA  
2161 TCATTGGCCG CTTCTAGGC CTGCAGTCCC ATGATACCA TCCTCCAGG GCAAACCTCAA  
2221 GGACCAAAC ACTGTGGCCC AAGAGGGAAT CCCTTCTCCA CGAGGGCCTG CCCAAAAACC  
2281 ACAAGGCAGC CAAACAGAAC GTTAGGGGCC AGGAAGACAA CAAGGCCCTGG AAGCTTAAGG  
2341 CTGTGGACGC CTTCAAGTCT GCCCCACTGT ATCAGAGGCC AGGCTACTAC AGTGCCCCAC  
2401 AGACGCCCT CAGCCCCACT CCCATGTTCT TCCCCCTAGA ACCATCAGCG CCGTCAAAGC  
2461 TTCACAGTGT CACAGGCATA GACACCAAAG ACAAAGCTT AAAGACTGTG AGTTCTGGGG  
2521 CCAAGAAAAG TTTTGAATTG CTCTCAGAGA GCGATGGGGC CTTGATGGAG CACCAGAAAG  
2581 TATCTCAAGT GAGGAGGAAA ACTGTGGAGT TTAACCTGAC GGATATGCCA GAGATCCCCG  
2641 AAAATCACCT CAAAGAACCT TTGGAACAAT CACCAACCAA CATAACACT AACTCAAAG  
2701 ATCACATGGA TCCTTATTGG GCCTTGGAAC ACAGGGATGA AGCACATTCC TAATCTAGCG  
2761 GCCGCGAATT CGATATCAAG CTTATCGATA ATCAACCTCT GGATTACAAA ATTTGTGAAA  
2821 GATTGACTGG TATTCTTAAC TATGTTGCTC CTTTTACGCT ATGTGGATAC GCTGCTTTAA  
2881 TGCCTTTGTA TCATGCTATT GCTTCCCGTA TGGCTTTCAT TTTCTCCTCC TTGTATAAAT  
2941 CCTGGTTGCT GTCTCTTTAT GAGGAGTTGT GGCCCGTTGT CAGGCAACGT GCGTGGTGT  
3001 GCACTGTGTT TGCTGACGCA ACCCCACTG GTTGGGGCAT TGCCACCACC TGTGAGCTCC  
3061 TTTCCGGGAC TTTGCTTTC CCCCTCCCTA TTGCCACGGC GGAATCATC GCCGCTGCC  
3121 TTGCCCCTG CTGGACAGGG GCTCGGCTGT TGGGCACTGA CAATTCCGTG GTGTTGTCCG  
3181 GGAAATCATC GTCCTTTCCT TGGCTGCTCG CCTGTGTTGC CACCTGGATT CTGCGCGGGA  
3241 CGTCCTTCTG CTACGTCCCT TCGGCCCTCA ATCCAGCGGA CCTTCCCTCC CGCGGCCTGC  
3301 TGCCGGCTCT GCGGCCTCTT CCGGTCTTC GCCTTCGCCC TCAGACGAGT CGGATCTCCC  
3361 TTTGGGCCGC CTCCCCGGCG GCCGCGCACC GTCGACTCGC TGATCAGCCT CACTGTGCC  
3421 TTCTAGTTGC CAGCCATCTG TTGTTTGCCC CTCCCCCTG CCTTCCCTGA CCCTGGAAGG  
3481 TGCCACTCCC ACTGTCTTTT CCTAATAAAA TGAGGAAATT GCATCGCATT GTCTGAGTAG  
3541 GTGTCATTCT ATTCTGGGGG GTGGGGTGGG GCAGGACAGC AAGGGGGAGG ATTGGGAAGA  
3601 CAATAGCAGG CATGCTGGGG ATGCGGTGGG CTCTATGGCT TCTGAGGCGG AAAGAACCAG

3661 CTGGGGCTCG ACTAGAGCAT GGCTACGTAG ATAAGTAGCA TGGCGGGTTA ATCATTAACT  
3721 ACAAGGAACC CCTAGTGATG GAGTTGGCCA CTCCCTCTCT GCGCGCTCGC TCGTCACTG  
3781 AGGCCGGGCG ACCAAAGGTC GCCCGACGCC CGGGCGGCCT CAGTGAGCGA GCGAGCGCGC  
3841 AGAGCTTTTT GCAAAGCCT AGGCCTCCAA AAAAGCCTCC TCACTACTTC TGAATAGCT  
3901 CAGAGGCCGA GCGGCCTCG GCCTCTGCAT AAATAAAAAA AATTAGTCAG CCATGGGGCG  
3961 GAGAATGGGC GGAAGTGGGC GGAGTTAGGG GCGGGATGGG CGGAGTTAGG GCGGGACTA  
4021 TGGTTGCTGA CTAATTGAGA TGCATGCTTT GCATACTTCT GCCTGCTGGG GAGCCTGGGG  
4081 ACTTTCCACA CCTGGTTGCT GACTAATTGA GATGCATGCT TTGCATACTT CTGCCTGCTG  
4141 GGGAGCCTGG GGAAGTTCCA CACCCTAACT GACACACATT CCACAGCTGC ATTAATGAAT  
4201 CGGCCAACGC GCGGGGAGAG GCGGTTTGCG TATTGGGCGC TCTTCCGCTT CCTCGCTCAC  
4261 TGACTCGCTG CGCTCGGTCG TTCGGCTGCG GCGAGCGGTA TCAGCTCACT CAAAGGCGGT  
4321 AATACGGTTA TCCACAGAAT CAGGGGATAA CGCAGGAAAAG AACATGTGAG CAAAAGGCCA  
4381 GCAAAGGCC AGGAACCGTA AAAAGGCCGC GTTGCTGGCG TTTTTCATA GGCTCCGCCC  
4441 CCCTGACGAG CATCACAAAA ATCGACGCTC AAGTCAGAGG TGGCGAAAAC CGACAGGACT  
4501 ATAAAGATAC CAGGCGTTTC CCCCTGGAAG CTCCCTCGTG CGCTCTCCTG TTCCGACCCT  
4561 GCCGCTTACC GGATACCTGT CCGCCTTTCT CCCTTCGGGA AGCGTGCGC TTTCTCATAG  
4621 CTCACGCTGT AGGTATCTCA GTTCGGTGTA GGTTCGTTTCG TCCAAGCTGG GCTGTGTGCA  
4681 CGAACCCCC GTTCAGCCCG ACCGCTGCGC CTTATCCGGT AACTATCGTC TTGAGTCCAA  
4741 CCCGGTAAGA CACGACTTAT CGCCACTGGC AGCAGCCACT GGTAACAGGA TTAGCAGAGC  
4801 GAGGTATGTA GCGGGTGCTA CAGAGTTCTT GAAGTGGTGG CCTAACTACG GCTACACTAG  
4861 AAGAACAGTA TTTGGTATCT GCGCTCTGCT GAAGCCAGTT ACCTTCGGAA AAAGAGTTGG  
4921 TAGCTCTTGA TCCGGCAAAC AAACCACCGC TGGTAGCGGT GGTTTTTTTG TTTGCAAGCA  
4981 GCAGATTACG CGCAGAAAAA AAGGATCTCA AGAAGATCCT TTGATCTTTT CTACGGGGTC  
5041 TGACGCTCAG TGGAACGAAA ACTCACGTTA AGGGATTTTG GTCATGAGAT TATCAAAAAG  
5101 GATCTTCACC TAGATCCTTT TAAATTAATA ATGAAGTTTT AAATCAATCT AAAGTATATA  
5161 TGAGTAAACT TGGTCTGACA GTTACCAATG CTTAATCAGT GAGGCACCTA TCTCAGCGAT  
5221 CTGTCTATTT CGTTCATCCA TAGTTGCCTG ACTCCTGCAA ACCACGTTGT GTCTCAAAAT  
5281 CTCTGATGTT ACATTGCACA AGATAAAAAT ATATCATCAT GAACAATAAA ACTGTCTGCT  
5341 TACATAAACA GTAATACAAG GGGTGTTATG AGCCATATTC AACGGGAAAC GTCTTGCTCG  
5401 AGGCCGCGAT TAAATTCCAA CATGGATGCT GATTTATATG GGTATAAATG GGCTCGCGAT  
5461 AATGTCGGGC AATCAGGTGC GACAATCTAT CGATTGTATG GGAAGCCCGA TCGCCAGAG  
5521 TTGTTTCTGA AACATGGCAA AGGTAGCGTT GCCAATGATG TTACAGATGA GATGGTCAGA  
5581 CTAAACTGGC TGACGGAATT TATGCCTCTT CCGACCATCA AGCATTTTAT CCGTACTCCT  
5641 GATGATGCAT GGTTACTCAC CACTGCGATC CCCGGGAAAA CAGCATTTCCA GGTATTAGAA  
5701 GAATATCCTG ATTCAGGTGA AAATATTGTT GATGCGCTGG CAGTGTTCCCT GCGCCGGTTG  
5761 CATTGATTC CTGTTTGTA TTTGCTTTTT AACAGCGATC GCGTATTTTC TCTCGCTCAG  
5821 GCGCAATCAC GAATGAATAA CGGTTTGGTT GATGCGAGTG ATTTTGATGA CGAGCGTAAT  
5881 GGCTGGCCTG TTGAACAAGT CTGGAAAGAA ATGCATAAGC TTTTGCCATT CTCACCGGAT  
5941 TCAGTCGTCA CTCATGGTGA TTTCTCACTT GATAACCTTA TTTTGTGACGA GGGGAAATTA  
6001 ATAGGTTGTA TTGATGTTGG ACGAGTCGGA ATCGCAGACC GATACCAGGA TCTTGCCATC  
6061 CTATGGAAGT GCCTCGGTGA GTTTTCTCCT TCATTACAGA AACGGCTTTT TCAAAAATAT  
6121 GGTATTGATA ATCCTGATAT GAATAAATTG CAGTTTCATT TGATGCTCGA TGAGTTTTTC  
6181 TAAGGGCGGC CTGCCACCAT ACCCACGCCG AAACAAGCGC TCATGAGCCC GAAGTGGCGA

6241 GCCCGATCTT CCCCATCGGT GATGTCGGCG ATATAGGCGC CAGCAACCGC ACCTGTGGCG  
6301 CCGGTGATGC CGGCCACGAT GCGTCCGGCG TAGAGGATCT GGCTAGCGAT GACCCTGCTG  
6361 ATTGGTTCGC TGACCATTTC CGGGTGCGGG ACGGCGTTAC CAGAAACTCA GAAGGTTCGT  
6421 CCAACCAAAC CGACTCTGAC GGCAGTTTAC GAGAGAGATG ATAGGGTCTG CTTCAGGGTG  
6481 ACCGATGTAA CCATATACTT AGGCTGGATC TTCTCCCGCG AATTTTAACC CTCACCAACT  
6541 ACGAGATATG AGGTAAGCCA AAAAAGCACG TAGTGGCGCT CTCCGACTGT TCCCAAATTG  
6601 TAACTTATCG TTCCGTGAAG GCCAGAGTTA CTTCCCGGCC CTTTCCATGC GCGCACCATA  
6661 CCCTCCTAGT TCCCCGGTTA TCTTTCCGAA GTGGGAGTGA GCGAACCTCC GTTTACGTCT  
6721 TGTTACCAAT GATGTAGCTA TGCACCTTGT ACAGGGTGCC AACGGGTTTC ACAATT CACA  
6781 GATAGTGGGG ATCCCGGCAA AGGGCCTATA TTTGCGGTCC AACTTAGGCG TAAACCTCGA  
6841 TGCTACCTAC TCAGACCCAC CTCGCGCGGG GTAAATAAGG CACTCATCCC AGCTGGTTCT  
6901 TGGCGTTCTA CGCAGCGACA TGTTTTATTAA CAGTTGTCTG GCAGCACAAA ACTTTTACCA  
6961 TGGTCGTAGA AGCCCCCAG AGTTAGTTCA TACCTAATGC CACAAATGTG ACAGGACGCC  
7021 GATGGGTACC GGACTTTAGG TCGAGCACAG TTCGGTAACG GAGAGACCTT GCGGCGTACT  
7081 TCATTATGTA TATGGAACGT GCCCAAGTGA CGCCAGGCAA GTCTCAGCTG GTTCCTGTGT  
7141 TAGCTCGAGG GTAGACATAC GAGCTGATTG AACATGGGTT GGGGGCCTCG AACCGTCGAG  
7201 GACCCCATAG TACCTCGGAG ACCAAGTAGG GCAGCCTATA GTTTGAAGCA GAACTATTTT  
7261 GGGGGGCGAG CCCTCATCGT CTCTTCTGCG GATGACTCAA CACGCTAGGG ACGTGAAGTC  
7321 GATTCCCTCG ATGGTTATAA ATCAAAGACT CAGAGTGCTG TCTGGAGCGT GAATCTAACG  
7381 GTACGTATCT CGATTGCTCG GTCGCTTTTC GCACTCCGCG AAAGTTCGTA CCGCTCATTC  
7441 ACTAGTTGC GAAGCCTATG CTGATATATG AATCCAAACT AGAGCAGGGC TCTTAAGATT  
7501 CGGAGTTGTA AATACTTAAT ACTCCAATCG GCTTTTACGT GCACCACCGC GGGCGGCTGA  
7561 CAAGGGTCTC ACATCGAGAA ACAAGACAGT TCCGGGCTGG AAGTAGCGCC GGCTAAGGAA  
7621 GACGCCTGGT ACGGCAGGAC TATGAAACCA GTACAAAGGC AACATCCTCA CTTGGGTGAA  
7681 CGGAAACGCA GTATTATGGT TACTTTTTGG ATACGTGAAA CATATCCCAT GGTAGTCCCT  
7741 AGACTTGGGA GTCTATCACC CCTAGGGCCC ATATCTGGAA ATAGACGCCA GGTGAATCC  
7801 GTATTTGGAG GTACGATGGA ACAGTCTGGG TGGGACGTGC TTCATTTATA CCCTGCGCAG  
7861 GCTGGACCGA GGACCGCAAG GTGCGGCGGT GCACAAGCAA TTGACAACCTA ACCACCGTGT  
7921 ATTCATTATG GTACCAGGAA CTTTAAGCCG AGTCAATGAA GCTCGCATTA CAGTGTTTAC  
7981 CGCATCTTGC CGTTACTCAC AAAGTGTGAT CCACCACAAG TCAAGCCATT GCCTCTCTGA  
8041 CACGCCGTAA GAATTAATAT GTAAACTTTG CGCGGGTTGA CTGCGATCCG TTCAGTCTCG  
8101 TCCGAGGGCA CAATCCTATT CCCATTTGTA TGTT CAGCTA ACTTCTACCC ATCCCCGAA  
8161 GTTAAGTAGG TCGTGAGATG CCATGGAGGC TCTCGTTCAT CCCGTGGGAC ATCAAGCTTC  
8221 CCCTTGATAA AGCACCCCGC TCGGGTGTAG CAGAGAAGAC GCCTTCTGAA TTGTGCAATC  
8281 CCTCCACCTT ATCTAAGCTT GCTACCAATA ATTAGCATTT TTGCCTTGCG ACAGACCTCC  
8341 TACTTAGATT GCCACACATT GAGCTAGTCA GTGAGCGATA AGCTTGACGC GCTTTCAAGG  
8401 GTCGCGAGTA CGTGAACCTA GGCTCCGGAC AGGACTATAT ACTTGGGTTT GATCTCGCCC  
8461 CGACAACCTG AAACCTCAAC TTTTTTAGAT TATATGGTTA GCCGAAGTTG CACGAGGTGG  
8521 CGTCCGCGGA CTGCTCCCCG AGTGTGGCTC TTTTCTCTGA CAACGTGCAA CCCCTATCGC  
8581 GGCCGATTGT TTCTGCGGAC GATGTTGTCC TCATAGTTTG GGCATGTTTC CCTTGTAGGT  
8641 GTGAAACCAC TTAGCTTCGC GCCGTAGTCC CAATGAAAAA CCTATGGACT TTGTTTTGGG  
8701 TAGCACCAGG AATCTGAACC GTGTGAATGT GGACGTCGCG CGCGTAGACC TTTATCTCCG  
8761 GTTCAAGCTA GGGATGTGGC TGCATGCTAC GTTGT CACAC CTACACTGCT CGAAGTAAAT

8821 ATGCGAAGCG CGCGGCCTGG CCGGAGGCGT TCCGCGCCGC CACGTGTTTCG TТААСТGTTG  
8881 АТТGGTGGCA CATAAGCAAT ATCGTAGTCC GTCAAATTCA GCTCTGTTAT CCCGGGCGTT  
8941 ATGTGTCAAA TGGCGTAGAA CGGGATTGAC TGTТTGACGG TAGGGTGACC TAAGCCAGAT  
9001 GCTACACAAT TAGGCTTGTA CATATTGTСG TTAGAACGCG GCTACAATTA ATACATAACC  
9061 TTATGTATCA TACACATACG ATTTAGGTGA CACTATAGAA TACACGGAAT TAATTC (SEQ  
ID NO: 14).

**[0105]** Таблица 2. Особенности плазмидной последовательности VMD2.IntEx.BEST1.WPRE.pA

Название	Тип	Минимум	Максимум	Длина	Направление
AAB2 ITR	LTR	4	133	130	прямое
от -585 до +38 промотор VMD2	промотор	189	811	623	прямое
Интрон	интрон	814	936	123	прямое
Экзон	экзон	937	989	53	прямое
Козак	Козак	990	999	10	прямое
BEST1	CDS	996	2753	1758	прямое
NotI	RBS	2758	2765	8	отсутствует
WPRE	WPRE	2784	3376	593	прямое
NotI	RBS	3378	3385	8	отсутствует
bGH pA	полиА_сигнал	3398	3666	269	прямое
AAB2 ITR	LTR	3724	3844	121	обратное
pBR322 rep происхождение	rep_происхождение	4408	5027	620	обратное
AphR (KanR)	CDS	5368	6183	816	прямое
BstEII	RBS	6477	6483	7	отсутствует
Случайно сгенерированная спейсерная последовательность	Спейсер	6484	8983	2500	отсутствует
BstEII	RBS	8984	8990	7	отсутствует

**[0106]** В некоторых вариантах осуществления, вирусный вектор доставки AAB содержит нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, кодирующую промотор CAG, последовательность, кодирующую белок BEST1, и последовательность, кодирующую WPRE. Типовой вирусный вектор доставки AAB в соответствии с настоящим изобретением, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую последовательность CAG.BEST1.WPRE.pA, содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты:

1 TAGCTGCGCG CTCGCTCGCT CACTGAGGCC GCCCGGGCAA AGCCCGGGCG TCGGGCGACC  
61 TTTGGTСGCC CGGCCTCAGT GAGCGAGCGA GCGCGCAGAG AGGGAGTGGC CAACTCCATC  
121 АСТАGGGGTT CСТTGТАGTT ААТGАТТААС ССGССАТGCT АСТТАТСТАС GTAGCCATGC

181 TCTAGGTACC ATTGACGTCA ATAATGACGT ATGTTCCCAT AGTAACGCCA ATAGGGACTT  
241 TCCATTGACG TCAATGGGTG GAGTATTTAC GGTAAACTGC CCACTTGGCA GTACATCAAG  
301 TGTATCATAT GCCAAGTACG CCCCCTATTG ACGTCAATGA CCGTAAATGG CCCGCTGGC  
361 ATTATGCCCA GTACATGACC TTATGGGACT TTCCTACTTG GCAGTACATC TACGTATTAG  
421 TCATCGCTAT TACCATGGTC GAGGTGAGCC CCACGTTCTG CTTCACTCTC CCCATCTCCC  
481 CCCCCTCCCC ACCCCCAATT TTGTATTTAT TTATTTTTTA ATTATTTTGT GCAGCGATGG  
541 GGGCGGGGGG GGGGGGGGGG CGCGCGCCAG GCGGGGCGGG GCGGGGCGAG GGGCGGGGCG  
601 GGGCGAGGCG GAGAGGTGCG GCGGCAGCCA ATCAGAGCGG CGCGCTCCGA AAGTTTCCTT  
661 TTATGGCGAG GCGGCGGGCG CGGCGGCCCT ATAAAAAGCG AAGCGCGCGG CGGGCGGGAG  
721 TCGCTGCGCG CTGCCTTCGC CCCGTGCCCC GCTCCGCCGC CGCCTCGCGC CGCCCGCCCC  
781 GGCTCTGACT GACCGCGTTA CTCCCACAGG TGAGCGGGCG GGACGGCCCT TCTCCTCCGG  
841 GCTGTAATTA GCGCTTGGTT TAATGACGGC TTGTTTCTTT TCTGTGGCTG CGTGAAAGCC  
901 TTGAGGGGCT CCGGGAGGGC CCTTTGTGCG GGGGGAGCGG CTCGGGGCTG TCCGCGGGGG  
961 GACGGCTGCC TTCGGGGGGG ACGGGGCGAG GCGGGGTTG GCTTCTGGCG TGTGACCGGC  
1021 GGCTCTAGAG CCTCTGCTAA CCATGTTTAT GCCTTCTTCT TTTTCTTACA GCTCCTGGGC  
1081 AACGTGCTGG TTATTGTGCT GTCTCATCAT TTTGGCAAAG AATTGGATCC GCGGCCGCG  
1141 CTTGGTACCG CCACCATGAC CATCACTTAC ACAAGCCAAG TGGCTAATGC CCGCTTAGGC  
1201 TCCTTCTCCC GCCTGCTGCT GTGCTGGCGG GGCAGCATCT ACAAGCTGCT ATATGGCGAG  
1261 TTCTTAATCT TCCTGCTCTG CTACTIONATC ATCCGCTTTA TTTATAGGCT GGCCCTCAGC  
1321 GAAGAACAAC AGCTGATGTT TGAGAACTG ACTCTGTATT GCGACAGTTA CATCCAGCTC  
1381 ATCCCCATTT CCTTCGTGCT GGGCTTCTAC GTGACGCTGG TCGTGACCCG CTGGTGGAAC  
1441 CAGTACGAGA ACCTGCCGTG GCCCGACCGC CTCATGAGCC TGGTGTCCGG CTTCGTGAA  
1501 GGCAAGGACG AGCAAGGCCG GCTGCTGCGG CGCACGCTCA TCCGCTACGC CAACCTGGGC  
1561 AACGTGCTCA TCCTGCGCAG CGTCAGCACC GCAGTCTACA AGCGCTTCCC CAGCGCCCAG  
1621 CACCTGGTGC AAGCAGGCTT TATGACTCCG GCAGAACACA AGCAGTTGGA GAAACTGAGC  
1681 CTACCACACA ACATGTTCTG GGTGCCCTGG GTGTGGTTTG CCAACCTGTC AATGAAGGCG  
1741 TGGCTTGGAG GTCGAATCCG GGACCCTATC CTGCTCCAGA GCCTGCTGAA CGAGATGAAC  
1801 ACCTTGCGTA CTCAGTGTGG ACACCTGTAT GCCTACGACT GGATTAGTAT CCCACTGGTG  
1861 TATACACAGG TGGTGAAGTGT GGCAGGTGAC AGCTTCTTCC TGACTIONTCT AGTTGGGCGG  
1921 CAGTTTCTGA ACCCAGCCAA GGCCTACCTT GGCCATGAGC TGGACCTCGT TGTGCCCGTC  
1981 TTCACGTTCC TGCAAGTCTT CTTCTATGTT GGCTGGCTGA AGGTGGCAGA GCAGCTCATC  
2041 AACCCCTTTG GAGAGGATGA TGATGATTTT GAGACCAACT GGATTGTGCA CAGGAATTTG  
2101 CAGGTGTCCC TGTTGGCTGT GGATGAGATG CACCAGGACC TGCCTCGGAT GGAGCCGGAC  
2161 ATGTACTIONGA ATAAGCCCGA GCCACAGCCC CCCTACACAG CTGCTTCCGC CCAGTTCCGT  
2221 CGAGCCTCCT TTATGGGCTC CACCTTCAAC ATCAGCCTGA ACAAAGAGGA GATGGAGTTC  
2281 CAGCCCAATC AGGAGGACGA GGAGGATGCT CACGCTGGCA TCATTGGCCG CTTCTTAGGC  
2341 CTGCAGTCCC ATGATCACCA TCCTCCCAGG GCAACTIONCAA GGACCAACTION ACTGTGGCCC  
2401 AAGAGGGAAT CCCTTCTCCA CGAGGGCCTG CCAACTIONACC ACAAGGCGAG CAAACAGAAC  
2461 GTTAGGGGCC AGGAAGACAA CAAGCCTGG AAGCTTAAAG CTGTGGACGC CTTCAAGTCT  
2521 GCCCCACTGT ATCAGAGGCC AGGCTACTION AGTGCCCCAC AGACGCCCCCT CAGCCCCACT  
2581 CCCATGTTCT TCCCCCTAGA ACCATCAGCG CCGTCAAAGC TTCACAGTGT CACAGGCATA  
2641 GACACCAAG ACAAAGCTT AAAGACTIONTG AGTTCTGGGG CCAAGACTION TTTTGAATTG  
2701 CTCTCAGAGA GCGATGGGGC CTTGATGGAG CACCAGAAAG TATCTCAAGT GAGGAGGAAA

2761 ACTGTGGAGT TTAACCTGAC GGATATGCCA GAGATCCCCG AAAATCACCT CAAAGAACCT  
2821 TTGGAACAAT CACCAACCAA CATAACACT ACACTCAAAG ATCACATGGA TCCTTATTGG  
2881 GCCTTGGAAC ACAGGGATGA AGCACATTCC TAAGAGCTCA AGCTTATCGA TAATCAACCT  
2941 CTGGATTACA AAATTTGTGA AAGATTGACT GGTATTCTTA ACTATGTTGC TCCTTTTACG  
3001 CTATGTGGAT ACGCTGCTTT AATGCCTTTG TATCATGCTA TTGCTTCCCG TATGGCTTTC  
3061 ATTTTCTCCT CCTTGTATAA ATCCTGGTTG CTGTCTCTTT ATGAGGAGTT GTGGCCCGTT  
3121 GTCAGGCAAC GTGGCGTGGT GTGCACTGTG TTTGCTGACG CAACCCCCAC TGGTTGGGGC  
3181 ATTGCCACCA CCTGTCAGCT CCTTTCCGGG ACTTTTCGCTT TCCCCCTCC TATTGCCACG  
3241 GCGGAACCTCA TCGCCGCTG CCTTGCCCGC TGCTGGACAG GGGCTCGGCT GTTGGGCACT  
3301 GACAATTCCG TGGTGTGTC GGGGAAATCA TCGTCCTTTC CTTGGCTGCT CGCCTGTGTT  
3361 GCCACCTGGA TTCTGCGCGG GACGTCCCTC TGCTACGTCC CTTGCGCCCT CAATCCAGCG  
3421 GACCTTCCCT CCCGCGGCCT GCTGCCGGCT CTGCGGCCTC TTCCGCGTCT TCGCCTTCGC  
3481 CCTCAGACGA GTCGGATCTC CCTTTGGGCC GCCTCCCCGC ATCGATAACG TCGACTCGCT  
3541 GATCAGCCTC GACTGTGCCT TCTAGTTGCC AGCCATCTGT TGTTTGCCCC TCCCCCGTGC  
3601 CTTCCCTTGAC CCTGGAAGGT GCCACTCCCA CTGTCCCTTTC CTAATAAAAAT GAGGAAATTG  
3661 CATCGCATTG TCTGAGTAGG TGTCATTCTA TTCTGGGGGG TGGGGTGGGG CAGGACAGCA  
3721 AGGGGGAGGA TTGGGAAGAC AATAGCAGGC ATGCTGGGGA TCGGGTGGGC TCTATGGCTT  
3781 CTGAGGCGGA AAGAACCAGC TGGGGCTCGA CTAGAGCATG GCTACGTAGA TAAGTAGCAT  
3841 GGCGGGTTAA TCATTAACCTA CAAGGAACCC CTAGTGATGG AGTTGGCCAC TCCCTCTCTG  
3901 CGCGCTCGCT CGCTCACTGA GGCCGGGCGA CCAAAGGTCG CCCGACGCC GGGCGGCCTC  
3961 AGTGAGCGAG CGAGCGCGCA GAGCTTTTTG CAAAAGCCTA GGCCTCCAAA AAAGCCTCCT  
4021 CACTACTTCT GGAATAGCTC AGAGGCCGAG GCGGCCCTCG CCTCTGCATA AATAAAAAAA  
4081 ATTAGTCAGC CATGGGGCGG AGAATGGGCG GAACTGGGCG GAGTTAGGGG CGGGATGGGC  
4141 GGAGTTAGGG GCGGGACTAT GGTGCTGAC TAATTGAGAT GCATGCTTTG CATACTTCTG  
4201 CCTGCTGGGG AGCCTGGGGA CTTTCCACAC CTGGTTGCTG ACTAATTGAG ATGCATGCTT  
4261 TGCATACTTC TGCCTGCTGG GGAGCCTGGG GACTTTCCAC ACCCTAACTG ACACACATTC  
4321 CACAGCTGCA TTAATGAATC GGCCAACGCG CGGGGAGAGG CGGTTTGCGT ATTGGGCGCT  
4381 CTTCCGCTTC CTCGCTCACT GACTCGCTGC GCTCGGTCTG TCGGCTGCGG CGAGCGGTAT  
4441 CAGCTCACTC AAAGGCGGTA ATACGGTTAT CCACAGAATC AGGGGATAAC GCAGGAAAGA  
4501 ACATGTGAGC AAAAGGCCAG CAAAAGGCCA GGAACCGTAA AAAGGCCGCG TTGCTGGCGT  
4561 TTTTCCATAG GCTCCGCCCC CCTGACGAGC ATCACAAAAA TCGACGCTCA AGTCAGAGGT  
4621 GCGGAAACCC GACAGGACTA TAAAGATAAC AGGCGTTTCC CCCTGGAAGC TCCCTCGTGC  
4681 GCTCTCCTGT TCCGACCCTG CCGCTTACCG GATACCTGTC CGCCTTCTC CCTTCGGGAA  
4741 GCGTGGCGCT TTCTCATAGC TCACGCTGTA GGTATCTCAG TTCGGTGTAG GTCGTTGCT  
4801 CCAAGCTGGG CTGTGTGCAC GAACCCCCCG TTCAGCCCGA CCGCTGCGCC TTATCCGGTA  
4861 ACTATCGTCT TGAGTCCAAC CCGGTAAGAC ACGACTTATC GCCACTGGCA GCAGCCACTG  
4921 GTAACAGGAT TAGCAGAGCG AGGTATGTAG GCGGTGCTAC AGAGTTCTTG AAGTGGTGGC  
4981 CTAACACTCG CTACACTAGA AGAACAGTAT TTGGTATCTG CGCTCTGCTG AAGCCAGTTA  
5041 CCTTCGAAA AAGAGTTGGT AGCTCTTGAT CCGGCAAACA AACCACCGCT GGTAGCGGTG  
5101 GTTTTTTTGT TTGCAAGCAG CAGATTACGC GCAGAAAAAA AGGATCTCAA GAAGATCCTT  
5161 TGATCTTTTC TACGGGGTCT GACGCTCAGT GGAACGAAAA CTCACGTTAA GGGATTTTGG  
5221 TCATGAGATT ATCAAAAAGG ATCTTACCT AGATCCTTTT AAATTAAAAA TGAAGTTTAA  
5281 AATCAATCTA AAGTATATAT GAGTAAACTT GGTCTGACAG TTACCAATGC TTAATCAGTG

5341 AGGCACCTAT CTCAGCGATC TGTCTATTTT GTTCATCCAT AGTTGCCTGA CTCCCCGTCCG  
5401 TGTAGATAAC TACGATACGG GAGGGCTTAC CATCTGGCCC CAGTGCTGCA ATGATACCGC  
5461 GAGACCCACG CTCACCGGCT CCAGATTTAT CAGCAATAAA CCAGCCAGCC GGAAGGGCCG  
5521 AGCGCAGAAG TGGTCCTGCA ACTTTATCCG CCTCCATCCA GTCTATTAAT TGTTCGGGG  
5581 AAGCTAGAGT AAGTAGTTCG CCAGTTAATA GTTTGCGCAA CGTTGTTGCC ATTGCTACAG  
5641 GCATCGTGGT GTCACGCTCG TCGTTTGGTA TGGCTTCATT CAGCTCCGGT TCCCAACGAT  
5701 CAAGGCGAGT TACATGATCC CCCATGTTGT GCAAAAAAGC GGTTAGCTCC TTCGGTCCCTC  
5761 CGATCGTTGT CAGAAGTAAG TTGGCCGAG TGTATCACT CATGGTTATG GCAGCACTGC  
5821 ATAATTCTCT TACTGTCATG CCATCCGTAA GATGCTTTTC TGTGACTGGT GAGTACTCAA  
5881 CCAAGTCATT CTGAGAATAG TGTATGCGGC GACCGAGTTG CTCTTGCCCG GCGTCAATAC  
5941 GGGATAATAC CGCGCCACAT AGCAGAACTT TAAAAGTGCT CATCATTTGA AACGTTCTT  
6001 CGGGGCGAAA ACTCTCAAGG ATCTTACCGC TGTGAGATC CAGTTCGATG TAACCCACTC  
6061 GTGCACCCAA CTGATCTTCA GCATCTTTTA CTTTCACCAG CGTTTCTGGG TGAGCAAAAA  
6121 CAGGAAGGCA AAATGCCGCA AAAAAGGGAA TAAGGGCGAC ACGGAAATGT TGAATACTCA  
6181 TACTCTTCCT TTTTCAATAT TATTGAAGCA TTTATCAGGG TTATTGTCTC ATGAGCGGAT  
6241 ACATATTTGA ATGTATTTAG AAAAATAAAC AAATAGGGGT TCCGCGCACA TTTCCCGGAA  
6301 AAGTGCCACC TGACGTCTAA GAAACCATTA TTATCATGAC ATTAACCTAT AAAAATAGGC  
6361 GTATCACGAG GCCCTTTCGT CTCGCGCGTT TCGGTGATGA CGGTGAAAAC CTCTGACACA  
6421 TGCAGCTCCC GGAGACGGTC ACAGCTTGTC TGTAAGCGGA TGCCGGGAGC AGACAAGCCC  
6481 GTCAGGGCGC GTCAGCGGGT GTTGGCGGGT GTCGGGGCTG GCTTAACTAT GCGGCATCAG  
6541 AGCAGATTGT ACTGAGAGTG CACCATTCTGA CGCTCTCCCT TATGCGACTC CTGCATTAGG  
6601 AAGCAGCCCA GTAGTAGGTT GAGGCCGTTG AGCACCGCCG CCGCAAGGAA TGGTGCATGC  
6661 AAGGAGATGG CGCCCAACAG TCCCCCGGCC ACGGGGCTG CCACCATACC CACGCCGAAA  
6721 CAAGCGCTCA TGAGCCCGAA GTGGCGAGCC CGATCTTCCC CATCGGTGAT GTCGGCGATA  
6781 TAGGCGCCAG CAACCGCACC TGTGGCGCCG GTGATGCCGG CCACGATGCG TCCGGCGTAG  
6841 AGGATCTGGC TAGCGATGAC CCTGCTGATT GGTTCGCTGA CCATTTCCGG GTGCGGGACG  
6901 GCGTTACCAG AAACCTCAGAA GGTTCGTCCA ACCAAACCGA CTCTGACGGC AGTTTACGAG  
6961 AGAGATGATA GGGTCTGCTT CAGTAAGCCA GATGCTACAC AATTAGGCTT GTACATATTG  
7021 TCGTTAGAAC GCGGCTACAA TTAATACATA ACCTTATGTA TCATACACAT ACGATTTAGG  
7081 TGACACTATA GAATACACGG AATTAATTC (SEQ Id No: 15).

[0107] Таблица 3. Особенности плазмидной последовательности CAG.BEST1.WPRE.PA

Название	Тип	Минимум	Максимум	Длина	Направление
AAB2 ITR	область_повторов	7 066	133	177	прямое
amp промотор	промотор	6 223	6 251	29	обратное
Ген AmpR	ген	5 321	6 181	861	обратное
Ген Bla	ген	5 321	5 983	663	обратное
ColE1 rep происхождение	rep_происхождение	4 503	5 176	674	прямое

SV40 происхождение	начало репликации	4 059	4 136	78	обратное
AAB2 ITR	область_повторов	3 864	4 000	137	обратное
bGH_PA term	терминатор	3 550	3 777	228	прямое
WPRE	прочий_признак	2 932	3 520	589	прямое
Экзон 10	экзон	2 895	2 913	19	прямое
Экзон 9	экзон	2 256	2 894	639	прямое
Экзон 8	экзон	2 104	2 255	152	прямое
Экзон 7	экзон	2 023	2 103	81	прямое
Экзон 6	экзон	1 870	2 022	153	прямое
Экзон 5	экзон	1 792	1 869	78	прямое
Экзон 4	экзон	1 637	1 791	155	прямое
Экзон 3	экзон	1 403	1 636	234	прямое
C>T	модифицированное_основание	1 368	1 368	1	прямое
Экзон 2	экзон	1 308	1 402	95	прямое
hBEST1 CDS	CDS	1 156	2 913	1 758	прямое
Экзон 1	экзон	1 156	1 307	152	прямое
Козак	неопределенный	1 147	1 155	9	прямое
	Вставка истории редактирования	<1133	1 138	>6	отсутствует
Промотор CAG	промотор	189	1 129	941	прямое
5'ITR в официальном файле последовательности REP1	LTR	64	183	120	прямое

**[0108]** В некоторых вариантах осуществления композиций в соответствии с настоящим изобретением вектор может содержать последовательность, кодирующую маркер, который может экспрессироваться в клетке, когда клетка находится либо *in vitro*, либо *in vivo*. Например, в векторе или последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением последовательность, кодирующая маркер, может использоваться вместо или может заменять последовательность, кодирующую белок BEST1 в соответствии с настоящим изобретением (например, последовательность, содержащую кодирующую последовательность гена BEST1). Иллюстративные маркеры в соответствии с настоящим изобретением включают, но не ограничиваются ими, флуорофорные белки, такие как GFP, YFP или dsRED, а также различные метки эпитопа, такие как FLAG, HA, His или Muc. Флуорофор или эпитопная метка может быть слита с кодирующей последовательностью BEST1, например, как N- или C-концевое слияние, или может быть использована вместо BEST1 для характеристики вектора в соответствии с настоящим изобретением. Примеры использования вектора, содержащего маркер в соответствии с настоящим изобретением,

включают, но не ограничиваются ими, характеристику экспрессии гена, например уровни экспрессии, или характеристику специфичности типа клетки вектора в соответствии с настоящим изобретением.

**[0109]** Примерный вектор в соответствии с настоящим изобретением, содержащий маркер, включает VMD2.GFP.WPRE.pA. Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая конструкцию

VMD2.GFP.WPRE.pA, включает или состоит из:

```
1 TAGCTGCGCG CTCGCTCGCT CACTGAGGCC GCCCGGGCAA AGCCCGGGCG TCGGGCGACC
61 TTTGGTCGCC CGGCCTCAGT GAGCGAGCGA GCGCGCAGAG AGGGAGTGGC CAACTCCATC
121 АСТАГГГГТТ ССТТГТАГТТ ААТГАТТААС ССГССАТГСТ АСТТАТСТАС ГТАГССАТГС
181 ТСТАГГТААА ТТСТГТСАТТ ТТАСТАГГГТ ГАТГАААТТС ССААГСААСА ССАТССТТТТ
241 САГАТААГГГ САСТГАГГСТ ГАГАГАГГГА СТГАААССТА СССГГГГТСА ССАСАСАСА
301 ГТГГСААГГС ТГГГАССАГА ААССАГГАСТ ГТТГАСТГСА ГСССГГТАТТ САТТСТТТСС
361 АТАГСССАСА ГГГСТГТСАА АГАСССАГГ ГССТАГТСАГ АГГСТССТСС ТТСТГГАГА
421 ГТТСТГГСА САГААГТТГА АГСТСАГСА АСССССТАА ССССААСТС ТСТТГСААГ
481 ГССТСАГГГГ ТСАГААСАСТ ГГТГГАГСА АТССТТТАГС СТСТГГАТТТ ТАГГГССАТГ
541 ГТАГАГГГГГ ТГТТГСССТА ААТТССАГСС СТГГТСТСАГ СССААСАСС ТССААГААГА
601 ААТТАГАГГГ ГССАТГГССА ГГСТГТГСТА ГССГТТГСТТ СТГАГСАГАТ ТАСААГААГГ
661 ГАСТААГАСА АГГАСТССТТ ТГТГГАГГТС СТГГСТТАГГ ГАГТСААГТГ АСГГСГГСТС
721 АГСАСТСАСГ ТГГГСАГТГС САГССТСТАА ГАГТГГГСАГ ГГГСАСТГГС САСАГАТСС
781 САГГГАГТСС САССАГССТА ГТСГССАГАС ССГСАССАТГ АСГААГГГСГ АГГААСТГТТ
841 САСТГГСГТГ ГТСССААТТС ТСГТГГААСТ ГГАТГГСГАТ ГТГААТГГГС АСАААТТТТС
901 ТГТСАГСГГА ГАГГГТГААГ ГТГАТГССАС АТАСГГАААГ СТСАСССТГА ААТТСАТСТГ
961 САССАСТГГА ААГСТСССТГ ТГССАТГГСС ААСАСТГГТС АСТАСССТГА ССТАТГГСГТ
1021 ГСАГТГСТТТ ТССАГАТАСС САГАССАТАТ ГААГСАГСАТ ГАСТТТТТСА АГАГСГССАТ
1081 ГСССГАГГГС ТАТГТГСАГ АГАГААССАТ СТТТТТСААА ГАТГАСГГГА АСТАСААГАС
1141 ССГСГСТГАА ГТСААГТТСГ ААГГТГАСАС ССТГГТГААТ АГААТСАГАС ТГААГГГСАТ
1201 ТГАСТТТААГ ГАГГАТГГАА АСАТТСТСГГ ССАСААГСТГ ГААТАСААСТ АТААСТСССА
1261 СААТГТГТАС АТСАТГГССГ АСААГСАААА ГААТГГСАТС ААГГТСААСТ ТСААГАТСАГ
1321 АСАСАСАТТ ГАГГАТГГАТ ССГТГСАГСТ ГСССГАССАТ ТАТСААСАГА АСАСТССААТ
1381 ССГСГАСГГС ССТГТГСТСС ТССАГАСАА ССАТТАССТГ ТССАСССАГТ СТГСССТГТС
1441 ТАААГАТСС ААСГААААГА ГАГАССАСАТ ГГТССТГСТГ ГАГТТТГТГА ССГТГСТГГ
1501 ГАТСАСАСАТ ГГСАТГГАСГ АГСТГТАСАА ГТГАААГСТТ АТСАГААТС ААСТСТГГА
1561 ТТАСААААТТ ТГТГАААГАТ ТГАСТГГТАТ ТСТТААСТАТ ГТТГСТССТТ ТТАСГСТАТГ
1621 ТГГАТАСГСТ ГСТТТААТГС СТТТГТАТСА ТГСТАТТГСТ ТСССГТАТГГ СТТТСАТТТТ
1681 СТССТССТГ ТАТАААТССТ ГГТТГСТГТС ТСТТТАТГАГ ГАГТТГТГГС ССГТТГТСАГ
1741 ГСААСГТГГС ГТГГТГТГСА СТГТГТТТГС ТГАСГСААСС СССАСТГГТТ ГГГГСАТТГС
1801 САССАСТГТ САГСТССТТТ ССГГГАСТТТ СССТТТСССС СТСССТАТТГ ССАСГГСГГА
1861 АСТСАТСГСС ГССТГССТТГ ССССГТГСТГ ГАСАГГГГСТ ССГСТГТТГГ ГСАСТГАСАА
1921 ТТССГТГГТГ ТТГТСГГГГА ААТСАТСГТС СТТТСССТГГ СТГСТСГССТ ГТГТТГССАС
1981 СТГГАТТСТГ ССГГГГАСГТ ССТТСТГСТА СГТСССТТСГ ГСССТСААТС САСГГГАССТ
2041 ТССТТСССГС ГССТГСТГС ССГСТСТСГС ГССТСТТССГ СГТСТТСГСС ТТСГСССТСА
2101 ГАСГАТСГГ АТСТСССТТТ ГСГССССТС ССССГСГССС ССГСАССГТС ГАСТСГСТГА
2161 ТСАГССТСА СТГТГССТТС ТАГТТГССАГ ССАТСТГТТГ ТТТГССССТС ССССГТГССТ
2221 ТССТТГАСС ТГГААГГТГС САСТСССАСТ ГТССТТТССТ ААТААААТГА ГГАААТТГСА
```

2281 TCGCATTGTC TGAGTAGGTG TCATTCTATT CTGGGGGGTG GGGTGGGGCA GGACAGCAAG  
2341 GGGGAGGATT GGGGAAGACAA TAGCAGGCAT GCTGGGGATG CGGTGGGCTC TATGGCTTCT  
2401 GAGGCGGAAA GAACCAGCTG GGGCTCGACT AGAGCATGGC TACGTAGATA AGTAGCATGG  
2461 CGGGTTAATC ATTAAC TACA AGGAACCCCT AGTGATGGAG TTGGCCACTC CCTCTCTGCG  
2521 CGCTCGCTCG CTCACTGAGG CCGGGCGACC AAAGGTCGCC CGACGCCCGG GCGGCCTCAG  
2581 TGAGCGAGCG AGCGCGCAGA GCTTTTTGCA AAAGCCTAGG CCTCCAAAAA AGCCTCCTCA  
2641 CTACTTCTGG AATAGCTCAG AGGCCGAGGC GGCCTCGGCC TCTGCATAAA TAAAAAAAAT  
2701 TAGTCAGCCA TGGGGCGGAG AATGGGCGGA ACTGGGCGGA GTTAGGGGCG GGATGGGCGG  
2761 AGTTAGGGGC GGGACTATGG TTGCTGACTA ATTGAGATGC ATGCTTTGCA TACTTCTGCC  
2821 TGCTGGGGAG CCTGGGGACT TTCCACACCT GGTGCTGAC TAATTGAGAT GCATGCTTTG  
2881 CATACTTCTG CCTGCTGGGG AGCCTGGGGA CTTTCCACAC CCTAACTGAC ACACATTTCCA  
2941 CAGCTGCATT AATGAATCGG CCAACGCGCG GGGAGAGGCG GTTTGCGTAT TGGGCGCTCT  
3001 TCCGCTTCCT CGCTCACTGA CTCGCTGCGC TCGGTCTGTT GGTGCGGGCG AGCGGTATCA  
3061 GCTCACTCAA AGGCGGTAAT ACGGTTATCC ACAGAATCAG GGGATAACGC AGGAAAAGAAC  
3121 ATGTGAGCAA AAGGCCAGCA AAAGGCCAGG AACCGTAAAA AGGCCGCGTT GCTGGCGTTT  
3181 TTCCATAGGC TCCGCCCCC TGACGAGCAT CACAAAAATC GACGCTCAAG TCAGAGGTGG  
3241 CGAAACCCGA CAGGACTATA AAGATAACCAG GCGTTTCCCC CTGGAAGCTC CCTCGTGCGC  
3301 TCTCCTGTTT CGACCCTGCC GCTTACCGGA TACCTGTCCG CCTTTCTCCC TTCGGGGAAGC  
3361 GTGGCGCTTT CTCATAGCTC ACGCTGTAGG TATCTCAGTT CGGTGTAGGT CGTTCGCTCC  
3421 AAGCTGGGCT GTGTGCACGA ACCCCCCGTT CAGCCCGACC GCTGCGCCTT ATCCGGTAAC  
3481 TATCGTCTTG AGTCCAACCC GGTAAGACAC GACTTATCGC CACTGGCAGC AGCCACTGGT  
3541 AACAGGATTA GCAGAGCGAG GTATGTAGGC GGTGCTACAG AGTTCTTGAA GTGGTGGCCT  
3601 AACTACGGCT AACTAGAAAG AACAGTATTT GGTATCTGCG CTCTGCTGAA GCCAGTTACC  
3661 TTCGAAAAA GAGTTGGTAG CTCTTGATCC GGCAAAACAAA CCACCCTGG TAGCGGTGGT  
3721 TTTTTTGT TTT GCAAGCAGCA GATTACGCGC AGAAAAAAG GATCTCAAGA AGATCCTTTG  
3781 ATCTTTTCTA CGGGGTCTGA CGCTCAGTGG AACGAAAACT CACGTTAAGG GATTTTGGTC  
3841 ATGAGATTAT CAAAAAGGAT CTTACACCTAG ATCCTTTTAA ATTAAAAATG AAGTTTAAAA  
3901 TCAATCTAAA GTATATATGA GTAAACTTGG TCTGACAGTT ACCAATGCTT AATCAGTGAG  
3961 GCACCTATCT CAGCGATCTG TCTATTTCTG TCATCCATAG TTGCCTGACT CCTGCAAACC  
4021 ACGTTGTGTC TCAAAATCTC TGATGTTACA TTGCACAAGA TAAAAATATA TCATCATGAA  
4081 CAATAAACT GTCTGCTTAC ATAAACAGTA ATACAAGGGG TGTTATGAGC CATATTTCAAC  
4141 GGGAAACGTC TTGCTCGAGG CCGCGATTAA ATTTCAACAT GGATGCTGAT TTATATGGGT  
4201 ATAAATGGGC TCGCGATAAT GTCGGGCAAT CAGGTGCGAC AATCTATCGA TTGTATGGGA  
4261 AGCCCGATGC GCCAGAGTTG TTTCTGAAAC ATGGCAAAGG TAGCGTTGCC AATGATGTTA  
4321 CAGATGAGAT GGTGAGACTA AACTGGCTGA CGGAATTTAT GCCTCTTCCG ACCATCAAGC  
4381 ATTTTATCCG TACTCCTGAT GATGCATGGT TACTCACCAC TGCGATCCCC GGGAAAAACAG  
4441 CATTCCAGGT ATTAGAAGAA TATCCTGATT CAGGTGAAAA TATTGTTGAT GCGCTGGCAG  
4501 TGTTCTGCG CCGGTTGCAT TCGATTCTG TTTGTAATTG TCCTTTTAAAC AGCGATCGCG  
4561 TATTTCTGCT CGCTCAGGCG CAATCACGAA TGAATAACGG TTTGGTTGAT GCGAGTGATT  
4621 TTGATGACGA GCGTAATGGC TGGCCTGTTG AACAAAGTCTG GAAAGAAATG CATAAGCTTT  
4681 TGCCATTCTC ACCGGATTCA GTCGCTACTC ATGGTGATTT CTCACTTGAT AACCTTATTT  
4741 TTGACGAGGG GAAATTAATA GGTGTATTG ATGTTGGACG AGTCGGAATC GCAGACCGAT  
4801 ACCAGGATCT TGCCATCCTA TGGAAGTACC TCGGTGAGTT TTCTCCTTCA TTACAGAAAC

4861 GGCTTTTTCA AAAATATGGT ATTGATAATC CTGATATGAA TAAATTGCAG TTTCATTTGA  
4921 TGCTCGATGA GTTTTTCTAA GGGCGCCTG CCACCATACC CACGCCGAAA CAAGCGCTCA  
4981 TGAGCCCGAA GTGGCGAGCC CGATCTTCCC CATCGGTGAT GTCGGCGATA TAGGCGCCAG  
5041 CAACCGCACC TGTGGCGCCG GTGATGCCGG CCACGATGCG TCCGGCGTAG AGGATCTGGC  
5101 TAGCGATGAC CCTGCTGATT GGTTCGCTGA CCATTTCCGG GTGCGGGACG GCGTTACCAG  
5161 AAACCTCAGAA GGTTCGTCCA ACCAAACCGA CTCTGACGGC AGTTTACGAG AGAGATGATA  
5221 GGGTCTGCTT CAGGGTGACC GATGTAACCA TATACTTAGG CTGGATCTTC TCCC CGGAAT  
5281 TTTAACCTC ACCAACTACG AGATATGAGG TAAGCCAAAA AAGCACGTAG TGGCGCTCTC  
5341 CGACTGTTCC CAAATTGTAA CTTATCGTTC CGTGAAGGCC AGAGTTACTT CCCGGCCCTT  
5401 TCCATGCGCG CACCATACCC TCCTAGTTCC CCGGTTATCT TTCCGAAGTG GGAGTGAGCG  
5461 AACCTCCGTT TACGTCTTGT TACCAATGAT GTAGCTATGC ACTTTGTACA GGGTGCCAAC  
5521 GGGTTTCA CA ATTACAGAT AGTGGGGATC CCGGC AAAAG GCCTATATTT GCGGTCCAAC  
5581 TTAGGCGTAA ACCTCGATGC TACCTACTCA GACCCACCTC GCGCGGGGTA AATAAGGCAC  
5641 TCATCCCAGC TGGTTCTTGG CGTTCTACGC AGCGACATGT TTATTAACAG TTGTCTGGCA  
5701 GCACAAA ACT TTTACCATGG TCGTAGAAGC CCCCAGAGT TAGTTCATAC CTAATGCCAC  
5761 AAATGTGACA GGACGCCGAT GGGTACCGGA CTTTAGGTCG AGCACAGTTC GGTAAACGGAG  
5821 AGACCCTGCG GCGTACTTCA TTATGTATAT GGAACGTGCC CAAGTGACGC CAGGCAAGTC  
5881 TCAGCTGGTT CCTGTGTTAG CTCGAGGGTA GACATACGAG CTGATTGAAC ATGGGTTGGG  
5941 GGCCTCGAAC CGTCGAGGAC CCCATAGTAC CTCGGAGACC AAGTAGGGCA GCCTATAGTT  
6001 TGAAGCAGAA CTATTTCCGG GGGCGAGCCC TCATCGTCTC TTCTGCGGAT GACTCAACAC  
6061 GCTAGGGACG TGAAGTCGAT TCCTTCGATG GTTATAAATC AAAGACTCAG AGTGCTGTCT  
6121 GGAGCGTGAA TCTAACGGTA CGTATCTCGA TTGCTCGGTC GCTTTTCGCA CTCCGCGAAA  
6181 GTTCGTACCG CTCATTCACT AGGTTGCGAA GCCTATGCTG ATATATGAAT CCAA ACTAGA  
6241 GCAGGGCTCT TAAGATTCGG AGTTGTAAAT ACTTAATACT CCAATCGGCT TTTACGTGCA  
6301 CCACCGCGGG CGGCTGACAA GGGTCTCACA TCGAGAAACA AGACAGTTCC GGGCTGGAAG  
6361 TAGCGCCGGC TAAGGAAGAC GCCTGGTACG GCAGGACTAT GAAACCAGTA CAAAGGCAAC  
6421 ATCCTCACTT GGGTGAACGG AAACGCAGTA TTATGGTTAC TTTTGGATA CGTGAAACAT  
6481 ATCCCATGGT AGTCCTTAGA CTTGGGAGTC TATCACCCCT AGGGCCCATA TCTGAAATA  
6541 GACGCCAGGT TGAATCCGTA TTTGGAGGTA CGATGGAACA GTCTGGGTGG GACGTGCTTC  
6601 ATTTATACCC TGCGCAGGCT GGACCGAGGA CCGCAAGGTG CGGCGGTGCA CAAGCAATTG  
6661 ACAACTAACC ACCGTGTATT CATTATGGTA CCAGGAACTT TAAGCCGAGT CAATGAAGCT  
6721 CGCATTACAG TGTTTACCGC ATCTTGCCGT TACTCACAAA CTGTGATCCA CCACAAGTCA  
6781 AGCCATTGCC TCTCTGACAC GCCGTAAGAA TTAATATGTA AACTTTGCGC GGGTTGACTG  
6841 CGATCCGTTT AGTCTCGTCC GAGGGCACAA TCCTATTCCC ATTTGTATGT TCAGCTAACT  
6901 TCTACCCATC CCCC GAAGTT AAGTAGGTCG TGAGATGCCA TGGAGGCTCT CGTTCATCCC  
6961 GTGGGACATC AAGCTTCCCC TTGATAAAGC ACCCCGCTCG GGTGTAGCAG AGAAGACGCC  
7021 TTCTGAATTG TGCAATCCCT CCACCTTATC TAAGCTTGCT ACCAATAATT AGCATTTTTG  
7081 CCTTGCGACA GACCTCCTAC TTAGATTGCC ACACATTGAG CTAGTCAGTG AGCGATAAGC  
7141 TTGACGCGCT TTCAAGGGTC GCGAGTACGT GAACTAAGGC TCCGGACAGG ACTATATACT  
7201 TGGGTTTGAT CTCGCCCCGA CAACTGCAAA CCTCAACTTT TTTAGATTAT ATGGTTAGCC  
7261 GAAGTTGCAC GAGGTGGCGT CCGCGGACTG CTCCCCGAGT GTGGCTCTTT CATCTGACAA  
7321 CGTGCAACCC CTATCGCGGC CGATTGTTTC TGCGGACGAT GTTGTCTTCA TAGTTTGGGC  
7381 ATGTTTCCCT TGTAGGTGTG AAACCACTTA GCTTCGCGCC GTAGTCCCAA TGAAAAACCT

7441 ATGGACTTTG TTTTGGGTAG CACCAGGAAT CTGAACCGTG TGAATGTGGA CGTCGCGCGC  
7501 GTAGACCTTT ATCTCCGGTT CAAGCTAGGG ATGTGGCTGC ATGCTACGTT GTCACACCTA  
7561 CACTGCTCGA AGTAAATATG CGAAGCGCGC GGCCTGGCCG GAGGCGTTCC GCGCCGCCAC  
7621 GTGTTCTGTTA ACTGTTGATT GGTGGCACAT AAGCAATATC GTAGTCCGTC AAATTCAGCT  
7681 CTGTTATCCC GGGCGTTATG TGTCAAATGG CGTAGAACGG GATTGACTGT TTGACGGTAG  
7741 GGTGACCTAA GCCAGATGCT ACACAATTAG GCTTGTACAT ATTGTCGTTA GAACGCGGCT  
7801 ACAATTAATA CATAACCTTA TGTATCATAС ACATACGATT TAGGTGACAC TATAGAATAC  
7861 ACGGAATTAA TTC (SEQ ID NO: 16).

**[0110]** Таблица 4. Особенности плазмидной последовательности VMD2.GFP.WPRE.pA

Название	Тип	Минимум	Максимум	Длина	Направление
Случайно сгенерированная спейсерная последовательность	Спейсер	5 241	7 740	2 500	отсутствует
AphR (KanR)	CDS	4 125	4 940	816	прямое
pBR322 rep происхождение	rep_происхождение	3 165	3 784	620	обратное
AAB2 ITR	LTR	2 481	2 601	121	обратное
bGH pA	полиА_сигнал	2 155	2 423	269	прямое
WPRE	WPRE	1 547	2 136	590	прямое
ЗФБ	прочий_признак	818	1 534	717	прямое
Козак	Козак	812	817	6	прямое
от -585 до +38 промотор VMD2	промотор	189	811	623	прямое
AAB2 ITR	LTR	4	133	130	прямое

**[0111]** Примерный вектор в соответствии с настоящим изобретением, содержащий маркер, включает VMD.IntEx.GFP.WPRE.pA. Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая конструкцию VMD.IntEx.GFP.WPRE.pA, включает или состоит из:

1 TAGCTGCGCG CTCGCTCGCT CACTGAGGCC GCCCGGGCAA AGCCCGGGCG TCGGGCGACC  
61 TTTGGTTCGCC CGGCCTCAGT GAGCGAGCGA GCGCGCAGAG AGGGAGTGGC CAACTCCATC  
121 АСТАГГГГТТ ССТТГТАГТТ ААТГАТТААС ССГССАТГСТ АСТТАТСТАС GTAGCCATGC  
181 ТСТАГГТААА ТТСТГТСАТТ ТТАСТАГГГТ GATGAAATTC CCAAGCAACA CCATCCTTTT  
241 СAGATAAGGG СACTGAGGCT GAGAGAGGAG СТGAAACCTA CCCGGGGTCA CCACACACAG  
301 GTGGCAAGGC TGGGACCAGA ААССАГГАСТ GTTGACTGCA GCCCGGTATT САТТСТТТСС  
361 АТАГСССАСА GGGCTGTCAA АGАССССАГГ GCCTAGTCAG АGGCTCCTCC ТТССТGGAGA  
421 GTTCCTGGCA СAGAAGTTGA АGСТСАГСАС АGСССССТАА СССССААСТС ТСТСТГСАAG  
481 GCCTCAGGGG TCAGAACAСТ GGTGGAGCAG АТССТТТАGС СТСТGGАТТТ TAGGGCCATG  
541 GTAGAGGGGG TGTTGCCCTA ААТТССАГСС СТGGTCTCAG СССААСАССС ТССААГААГА

601 AATTAGAGGG GCCATGGCCA GGCTGTGCTA GCCGTTGCTT CTGAGCAGAT TACAAGAAGG  
661 GACTAAGACA AGGACTCCTT TGTGGAGGTC CTGGCTTAGG GAGTCAAGTG ACGGCGGCTC  
721 AGCACTCACG TGGGCAGTGC CAGCCTCTAA GAGTGGGCAG GGGCACTGGC CACAGAGTCC  
781 CAGGGAGTCC CACCAGCCTA GTCGCCAGAC CGGGTGCCGC AGGGGGACGG CTGCCTTCGG  
841 GGGGGACGGG GCAGGGCGGG GTTCGGCTTC TGGCGTGTGA CCGGCGGCTC TAGAGCCTCT  
901 GCTAACCATG TTCATGCCTT CTTCTTTTTTCTACAGCTCC TGGGCAACGT GCTGGTTATP  
961 GTGCTGTCTC ATCATTTTTGG CAAAGAATTG GCACCATGAG CAAGGGCGAG GAACTGTTCA  
1021 CTGGCGTGGT CCCAATTCTC GTGGAACCTGG ATGGCGATGT GAATGGGCAC AAATTTTTCTG  
1081 TCAGCGGAGA GGGTGAAGGT GATGCCACAT ACGGAAAGCT CACCCTGAAA TTCATCTGCA  
1141 CCACTGGAAA GCTCCCTGTG CCATGGCCAA CACTGGTCAC TACCCTGACC TATGGCGTGC  
1201 AGTGCTTTTT CAGATACCCA GACCATATGA AGCAGCATGA CTTTTTCAAG AGCGCCATGC  
1261 CCGAGGGCTA TGTGCAGGAG AGAACCATCT TTTTCAAAGA TGACGGGAAC TACAAGACCC  
1321 GCGCTGAAGT CAAGTTCGAA GGTGACACCC TGGTGAATAG AATCGAGCTG AAGGGCATTG  
1381 ACTTTAAGGA GGATGGAAAC ATTCTCGGCC ACAAGCTGGA ATACAACATAT AACTCCCACA  
1441 ATGTGTACAT CATGGCCGAC AAGCAAAAGA ATGGCATCAA GGTCAACTTC AAGATCAGAC  
1501 ACAACATTGA GGATGGATCC GTGCAGCTGG CCGACCATTA TCAACAGAAC ACTCCAATCG  
1561 GCGACGGCCC TGTGCTCCTC CCAGACAACC ATTACCTGTC CACCCAGTCT GCCCTGTCTA  
1621 AAGATCCCAA CGAAAAGAGA GACCACATGG TCCTGCTGGA GTTTGTGACC GCTGCTGGGA  
1681 TCACACATGG CATGGACGAG CTGTACAAGT GAAAGCTTAT CGATAATCAA CCTCTGGATT  
1741 ACAAATTTG TGAAAGATTG ACTGGTATTC TTAACATATGT TGCTCCTTTT ACGCTATGTG  
1801 GATACGCTGC TTTAATGCCT TTGTATCATG CTATTGCTTC CCGTATGGCT TTCATTTTTCT  
1861 CCTCCTTGTA TAAATCCTGG TTGCTGTCTC TTTATGAGGA GTTGTGGCCC GTTGTGAGGC  
1921 AACGTGGCGT GGTGTGCACT GTGTTTGTG ACGCAACCCC CACTGGTTGG GGCATTGCCA  
1981 CCACCTGTCA GCTCCTTTCC GGGACTTTCC CTTTCCCCCT CCCTATTGCC ACGGCGGAAC  
2041 TCATCGCCGC CTGCCTTGCC CGCTGCTGGA CAGGGGCTCG GCTGTTGGGC ACTGACAATT  
2101 CCGTGGTGTG GTCGGGGAAA TCATCGTCTT TTCCTTGGCT GCTCGCTGT GTTGCCACCT  
2161 GGATTCTGCG CGGGACGTCC TTCTGCTACG TCCCTTCGGC CCTCAATCCA GCGGACCTTC  
2221 CTTCCCGCGG CCTGCTGCCG GCTCTGCGGC CTCTTCCGCG TCTTCGCTT CGCCCTCAGA  
2281 CGAGTCGGAT CTCCCTTTGG GCCGCCTCCC CGGCGGCCGC GCACCGTCGA CTCGCTGATC  
2341 AGCCTCGACT GTGCCTTCTA GTTGCCAGCC ATCTGTTGTT TGCCCCTCCC CCGTGCCTTC  
2401 CTTGACCCTG GAAGGTGCCA CTCCCCTGT CTTTCTCTAA TAAATGAGG AAATTCATC  
2461 GCATTGTCTG AGTAGGTGTC ATTCTATTCT GGGGGGTGGG GTGGGGCAGG ACAGCAAGGG  
2521 GGAGGATTGG GAAGACAATA GCAGGCATGC TGGGGATGCG GTGGGCTCTA TGGCTTCTGA  
2581 GGCAGAAAGA ACCAGCTGGG GCTCGACTAG AGCATGGCTA CGTAGATAAG TAGCATGGCG  
2641 GGTTAATCAT TAACTACAAG GAACCCCTAG TGATGGAGTT GGCCACTCCC TCTCTGCGCG  
2701 CTCGCTCGCT CACTGAGGCC GGGCGACCAA AGGTGCGCCG ACGCCCGGGC GGCCTCAGTG  
2761 AGCGAGCGAG CGCGCAGAGC TTTTTGCAA AGCCTAGGCC TCCAAAAAAG CCTCCTCACT  
2821 ACTTCTGGAA TAGCTCAGAG GCCGAGGCGG CCTCGGCTC TGCATAAATA AAAAAAATTA  
2881 GTCAGCCATG GGGCGGAGAA TGGGCGGAAC TGGGCGGAGT TAGGGGCGGG ATGGGCGGAG  
2941 TTAGGGGCGG GACTATGGTT GCTGACTAAT TGAGATGCAT GCTTTGCATA CTCTGCTG  
3001 CTGGGGAGCC TGGGGACTTT CCACACCTGG TTGCTGACTA ATTGAGATGC ATGCTTTGCA  
3061 TACTTCTGCC TGCTGGGGAG CCTGGGGACT TTCCACACCC TAACTGACAC ACATTCACACA  
3121 GCTGCATTAA TGAATCGGCC AACGCGCGGG GAGAGGCGGT TTGCGTATTG GCGGCTCTTC

3181 CGCTTCCTCG CTCACTGACT CGCTGCGCTC GGTTCGTTTCGG CTGCGGGCGAG CGGTATCAGC  
3241 TCACTCAAAG GCGGTAATAC GGTATCCAC AGAATCAGGG GATAACGCAG GAAAGAACAT  
3301 GTGAGCAAAA GGCCAGCAAA AGGCCAGGAA CCGTAAAAAG GCCGCGTTGC TGGCGTTTTT  
3361 CCATAGGCTC CGCCCCCTG ACGAGCATCA CAAAAATCGA CGCTCAAGTC AGAGGTGGCG  
3421 AAACCCGACA GGACTIONATAA GATACCAGGC GTTTCCCCCT GGAAGCTCCC TCGTGCGCTC  
3481 TCCTGTTCCG ACCCTGCCGC TTACCCGATA CCTGTCCGCC TTTCTCCCTT CGGGAAGCGT  
3541 GGCGCTTTCT CATAGCTCAC GCTGTAGGTA TCTCAGTTCG GTGTAGGTCG TTCGCTCCAA  
3601 GCTGGGCTGT GTGCACGAAC CCCCCGTTCA GCCCGACCGC TGCGCCTTAT CCGGTAACATA  
3661 TCGTCTTGAG TCCAACCCGG TAAGACACGA CTTATCGCCA CTGGCAGCAG CCACTGGTAA  
3721 CAGGATTAGC AGAGCGAGGT ATGTAGGCGG TGCTACAGAG TTCTTGAAGT GGTGGCCTAA  
3781 CTACGGCTAC ACTAGAAGAA CAGTATTTGG TATCTGCGCT CTGCTGAAGC CAGTTACCTT  
3841 CGGAAAAGA GTTGGTAGCT CTTGATCCGG CAAACAAACC ACCGCTGGTA GCGGTGGTTT  
3901 TTTTGTTCG AAGCAGCAGA TTACGCGCAG AAAAAAAGGA TCTCAAGAAG ATCCTTTGAT  
3961 CTTTTCTACG GGGTCTGACG CTCAGTGAA CGAAAACTCA CGTTAAGGGA TTTTGGTCAT  
4021 GAGATTATCA AAAAGGATCT TCACCTAGAT CCTTTTAAAT TAAAAATGAA GTTTTAAATC  
4081 AATCTAAAGT ATATATGAGT AAACCTGGTC TGACAGTTAC CAATGCTTAA TCAGTGAGGC  
4141 ACCTATCTCA GCGATCTGTC TATTTTCGTTT ATCCATAGTT GCCTGACTCC TGCAAACCAC  
4201 GTTGTGTCTC AAAATCTCTG ATGTTACATT GCACAAGATA AAAATATATC ATCATGAACA  
4261 ATAAACTGT CTGCTTACAT AAACAGTAAT ACAAGGGGTG TTATGAGCCA TATTCAACGG  
4321 GAAACGTCTT GCTCGAGGCC GCGATTAAAT TCCAACATGG ATGCTGATTT ATATGGGTAT  
4381 AAATGGGCTC GCGATAATGT CGGGCAATCA GGTGCGACAA TCTATCGATT GTATGGGAAG  
4441 CCCGATGCGC CAGAGTTGTT TCTGAAACAT GGCAAAGGTA GCGTTGCCAA TGATGTTACA  
4501 GATGAGATGG TCAGACTAAA CTGGCTGACG GAATTTATGC CTCTTCCGAC CATCAAGCAT  
4561 TTTATCCGTA CTCCTGATGA TGCATGGTTA CTCACCACTG CGATCCCCGG GAAAACAGCA  
4621 TTCCAGGTAT TAGAAGAATA TCCTGATTCA GGTGAAAATA TTGTTGATGC GCTGGCAGTG  
4681 TTCCTGCGCC GGTTCGATTC GATTCCTGTT TGTAATTGTC CTTTTAACAG CGATCGCGTA  
4741 TTTTCGTCTCG CTCAGGCGCA ATCACGAATG AATAACGGTT TGGTTGATGC GAGTGATTTT  
4801 GATGACGAGC GTAATGGCTG GCCTGTTGAA CAAGTCTGGA AAGAAATGCA TAAGCTTTTG  
4861 CCATTCTCAC CGGATTCAGT CGTCACTCAT GGTGATTTCT CACTTGATAA CCTTATTTTT  
4921 GACGAGGGGA AATTAATAGG TTGTATTGAT GTTGGACGAG TCGGAATCGC AGACCGATAC  
4981 CAGGATCTTG CCATCCTATG GAACTGCCTC GGTGAGTTTT CTCTTCATT ACAGAAACGG  
5041 CTTTTTCAA AATATGGTAT TGATAATCCT GATATGAATA AATTGCAGTT TCATTTGATG  
5101 CTCGATGAGT TTTTCTAAGG GCGGCCTGCC ACCATACCCA CGCCGAAACA AGCGCTCATG  
5161 AGCCCGAAGT GGCGAGCCCG ATCTTCCCCA TCGGTGATGT CGGCGATATA GGCGCCAGCA  
5221 ACCGCACCTG TGGCGCCGGT GATGCCGGCC ACGATGCGTC CGGCGTAGAG GATCTGGCTA  
5281 GCGATGACCC TGCTGATTGG TTCGCTGACC ATTTCCGGGT GCGGGACGGC GTTACCAGAA  
5341 ACTCAGAAGG TTCGTCCAAC CAAACCGACT CTGACGGCAG TTTACGAGAG AGATGATAGG  
5401 GTCTGCTTCA GGGTGACCGA TGTAACCATA TACTTAGGCT GGATCTTCTC CCGCGAATTT  
5461 TAACCCTCAC CAACTACGAG ATATGAGGTA AGCCAAAAAA GCACGTAGTG GCGCTCTCCG  
5521 ACTGTTCCCA AATTGTAACT TATCGTTCCG TGAAGGCCAG AGTTACTTCC CGGCCCTTTC  
5581 CATGCGCGCA CCATACCCTC CTAGTTCCCC GGTATCTTTT CCGAAGTGGG AGTGAGCGAA  
5641 CCTCCGTTTA CGTCTTGTTA CCAATGATGT AGCTATGCAC TTTGTACAGG GTGCCAACGG  
5701 GTTTCACAAT TCACAGATAG TGGGGATCCC GGCAAAGGGC CTATATTTGC GGTCCAACCT

5761 AGGCGTAAAC CTCGATGCTA CCTACTCAGA CCCACCTCGC GCGGGGTAAA TAAGGCACTC  
5821 ATCCCAGCTG GTTCTTGGCG TTCTACGCAG CGACATGTTT ATTAACAGTT GTCTGGCAGC  
5881 ACAAACCTTT TACCATGGTC GTAGAAGCCC CCCAGAGTTA GTTCATACCT AATGCCACAA  
5941 ATGTGACAGG ACGCCGATGG GTACCCGACT TTAGGTCGAG CACAGTTCGG TAACGGAGAG  
6001 ACCCTGCGGC GACTTTCATT ATGTATATGG AACGTGCCCA AGTGACGCCA GGCAAGTCTC  
6061 AGCTGGTTCC TGTGTTAGCT CGAGGGTAGA CATAACGAGCT GATTGAACAT GGGTTGGGGG  
6121 CCTCGAACCG TCGAGGACCC CATAGTACCT CGGAGACCAA GTAGGGCAGC CTATAGTTTG  
6181 AAGCAGAACT ATTTTCGGGG GCGAGCCCTC ATCGTCTCTT CTGCGGATGA CTCAACACGC  
6241 TAGGGACGTG AAGTCGATTC CTTTCGATGGT TATAAATCAA AGACTCAGAG TGCTGTCTGG  
6301 AGCGTGAATC TAACGGTACG TATCTCGATT GCTCGGTTCG TTTTCGCACT CCGCGAAAGT  
6361 TCGTACCGCT CATTCACTAG GTTGCGAAGC STATGCTGAT ATATGAATCC AAACCTAGAGC  
6421 AGGGCTCTTA AGATTTCGGAG TTGTAAATAC TTAATACTCC AATCGGCTTT TACGTGCACC  
6481 ACCGCGGGCG GCTGACAAGG GTCTCACATC GAGAAACAAG ACAGTTCGGG GCTGGAAGTA  
6541 GCGCCGGCTA AGGAAGACGC CTGGTACGGC AGGACTATGA AACCAGTACA AAGGCAACAT  
6601 CCTCACTTGG GTGAACGGAA ACGCAGTATT ATGGTTACTT TTTGGATACG TGAAACATAT  
6661 CCCATGGTAG TCCTTAGACT TGGGAGTCTA TCACCCCTAG GGCCCATATC TGAAATAGA  
6721 CGCCAGGTTG AATCCGTATT TGGAGGTACG ATGGAACAGT CTGGGTGGGA CGTGCTTCAT  
6781 TTATACCCTG CGCAGGCTGG ACCGAGGACC GCAAGGTGCG GCGGTGCACA AGCAATTGAC  
6841 AACTAACCCAC CGTGTATTCA TTATGGTACC AGGAACCTTA AGCCGAGTCA ATGAAGCTCG  
6901 CATTACAGTG TTTACCGCAT CTTGCCGTTA CTCACAAACT GTGATCCACC ACAAGTCAAG  
6961 CCATTGCCTC TCTGACACGC CGTAAGAATT AATATGTAAC CTTTGCAGCG GTTGACTGCG  
7021 ATCCGTTTCA TCTCGTCCGA GGGCACAATC STATTCCCAT TTGTATGTTT AGCTAACTTC  
7081 TACCCATCCC CCGAAGTTAA GTAGGTTCGTG AGATGCCATG GAGGCTCTCG TTCATCCCCT  
7141 GGGACATCAA GCTTCCCCTT GATAAAGCAC CCCGCTCGGG TGTAGCAGAG AAGACGCCTT  
7201 CTGAATTGTG CAATCCCTCC ACCTTATCTA AGCTTGCTAC CAATAATTAG CATTTTTGCC  
7261 TTGCGACAGA CCTCCTACTT AGATTGCCAC ACATTGAGCT AGTCAGTGAG CGATAAGCTT  
7321 GACGCGCTTT CAAGGGTTCG GAGTACGTGA ACTAAGGCTC CGGACAGGAC TATATACTTG  
7381 GGTTTTGATCT CGCCCCGACA ACTGCAAACC TCAACTTTTT TAGATTATAT GGTTAGCCGA  
7441 AGTTGCACGA GGTGGCGTCC GCGGACTGCT CCCCAGTGTG GGCTCTTTCA TCTGACAACG  
7501 TGCAACCCCT ATCGCGGCCG ATTGTTTCTG CGGACGATGT TGTCCATATA GTTTGGGCAT  
7561 GTTTCCCTTG TAGGTGTGAA ACCACTTAGC TTCGCGCCGT AGTCCCAATG AAAAACTAT  
7621 GGACTTTGTT TTGGGTAGCA CCAGGAATCT GAACCGTGTG AATGTGGACG TCGCGCGCGT  
7681 AGACCTTTAT CTCGGGTTCA AGCTAGGGAT GTGGCTGCAT GCTACGTTGT CACACCTACA  
7741 CTGCTCGAAG TAAATATGCG AAGCGCGCGG CCTGGCCGGA GCGGTTCCGC GCCGCCACGT  
7801 GTTCGTTAAC TGTTGATTGG TGGCACATAA GCAATATCGT AGTCCGTCAA ATTCAGCTCT  
7861 GTTATCCCGG GCGTTATGTG TCAAATGGCG TAGAACGGGA TTGACTGTTT GACGGTAGGG  
7921 TGACCTAAGC CAGATGCTAC ACAATTAGGC TTGTACATAT TGTGTTTAGA ACGCGGCTAC  
7981 AATTAATACA TAACCTTATG TATCATAAC ACACGATTTA GGTGACACTA TAGAATACAC  
8041 GGAATTAATT C (SEQ ID NO: 17).

[0112] Таблица 5. Особенности плазмидной последовательности VMD2.IntEx.GFP.WPRE.pA

Название	Тип	Минимум	Максимум	Длина	Направление
----------	-----	---------	----------	-------	-------------

Случайно сгенерированная спейсерная последовательность	Спейсер	5 419	7 918	2 500	отсутствует
AphR (KanR)	CDS	4 303	5 118	816	прямое
pBR322 гер происхождение	гер_происхождение	3 343	3 962	620	обратное
AAB2 ITR	LTR	2 659	2 779	121	обратное
bGH pA	полиА_сигнал	2 333	2 601	269	прямое
WPRE	WPRE	1 725	2 314	590	прямое
ЗФБ	прочий_признак	996	1 712	717	прямое
Козак	Козак	990	995	6	прямое
Экзон	экзон	937	989	53	прямое
Интрон	интрон	814	936	123	прямое
от -585 до +38 промотор VMD2	промотор	189	811	623	прямое
AAB2 ITR	LTR	4	133	130	прямое

#### Частицы ААВ

**[0113]** Векторы ААВ в соответствии с настоящим изобретением содержат геном ААВ, который был дериватизирован с целью введения пациентам. Такая дериватизация является стандартной в данной области техники, и настоящее изобретение охватывает использование любых известных производных генома ААВ и производных, которые могут быть получены с применением способов, известных в данной области техники. Обзор дериватизации генома ААВ и капсида ААВ представлен в Coura and Nardi (2007) *Virology Journal* 4: 99, и в Choi et al. и Wu et al., упомянутых выше.

**[0114]** Производные генома ААВ включают любые усеченные или модифицированные формы генома ААВ, которые позволяют трансгену из вектора по настоящему изобретению экспрессироваться *in vivo*. Можно значительно усечь геном ААВ, чтобы включить минимальную вирусную последовательность, сохранив при этом указанную выше функцию. Это предпочтительно из соображений безопасности, чтобы снизить риск рекомбинации вектора с вирусом дикого типа, а также избежать запуска клеточного иммунного ответа из-за присутствия белков вирусных генов в клетке-мишени.

**[0115]** Следовательно, в производном по изобретению могут быть удалены следующие участки: одна последовательность инвертированного концевой повтора (ITR), гены репликации (гер) и капсида (сар). Однако в некоторых вариантах осуществления производные могут дополнительно включать один или более генов гер и/или сар или другие вирусные последовательности генома ААВ. Встречающийся в природе ААВ с высокой частотой интегрируется в конкретный участок хромосомы 19 человека и демонстрирует незначительную частоту случайной интеграции, так что сохранение интегративной способности вектора может быть допущено в терапевтических условиях.

**[0116]** Геном ААВ включает гены упаковки, такие как гены гер и/или сар, которые кодируют функции упаковки для частицы ААВ. Ген гер кодирует один или более белков Rep78, Rep68, Rep52 и Rep40 или их варианты. Ген сар кодирует один или более капсидных белков, таких как VP1, VP2 и VP3 или их варианты. Эти белки составляют капсид частицы ААВ.

**[0117]** Когда производное включает капсидные белки, то есть VP1, VP2 и/или VP3, производное может быть химерным, перетасованным или с модифицированным капсидом производным одного или более встречающихся в природе ААВ. В частности, изобретение включает обеспечение последовательностей капсидных белков из разных серотипов, клад, клонов или изолятов ААВ в одном и том же векторе (т.е. псевдотипическом векторе).

**[0118]** Выбирают химерные, перетасованные или с модифицированным капсидом производные, чтобы обеспечить одну или более желаемых функциональностей вирусного вектора. Таким образом, эти производные могут демонстрировать повышенную эффективность доставки генов, пониженную иммуногенность (гуморальную или клеточную), измененный диапазон тропизма и/или улучшенное нацеливание на конкретный тип клеток по сравнению с вектором ААВ, содержащим природный геном ААВ, такой как геном ААВ2. Повышенная эффективность доставки гена может быть достигнута за счет улучшенного связывания рецептора или корецептора на поверхности клетки, улучшенной интернализации, улучшенного переноса внутри клетки и в ядро, улучшенного распаковывания вирусной частицы и улучшенного преобразования одноцепочечного генома в двухцепочечную форму. Повышенная эффективность может также относиться к измененному диапазону тропизма или нацеливанию на конкретную популяцию клеток, так что доза вектора не разбавляется введением в ткани, где она не нужна.

**[0119]** Химерные капсидные белки включают те, которые образуются путем рекомбинации между двумя или более последовательностями, кодирующими капсид природных серотипов ААВ. Это может быть выполнено, например, с помощью подхода спасения генетических маркеров, при котором неинфекционные последовательности капсида одного серотипа котрансфицируются с последовательностями капсида другого серотипа, и используется направленный отбор для отбора последовательностей капсида, имеющих желаемые свойства. Последовательности капсида различных серотипов могут быть изменены путем гомологичной рекомбинации внутри клетки для получения новых химерных капсидных белков.

**[0120]** Химерные капсидные белки также включают белки, полученные путем конструирования последовательностей капсидных белков для переноса доменов конкретных капсидных белков, поверхностных петель или определенных аминокислотных остатков между двумя или более капсидными белками, например, между двумя или более капсидными белками разных серотипов.

**[0121]** Перетасованные или химерные капсидные белки также могут быть созданы перетасовкой ДНК или подверженной ошибкам ПЦР. Гибридные капсидные гены ААВ могут быть созданы путем случайного фрагментирования последовательностей родственных генов ААВ, например, генов, кодирующих капсидные белки нескольких различных серотипов, а затем последующей повторной сборки фрагментов в самопримированной полимеразной реакции, которая также может вызывать кроссоверы в областях гомологии последовательностей. Библиотека гибридных генов ААВ, созданная таким образом путем перетасовки генов капсида нескольких серотипов, может быть подвергнута скринингу для идентификации вирусных клонов, имеющих желаемую функциональность. Точно так же подверженная ошибкам ПЦР может использоваться для случайной мутации генов капсида ААВ для создания разнообразной библиотеки вариантов, которые затем могут быть отобраны по желаемому свойству.

**[0122]** Последовательности генов капсида также могут быть генетически модифицированы для введения специфических делеций, замен или вставок по отношению к нативной последовательности дикого типа. В частности, гены капсида могут быть изменены путем вставки последовательности неродственного белка или пептида в открытую рамку считывания кодирующей последовательности капсида или на N- и/или C-конце

кодирующей последовательности капсида. Неродственный белок или пептид может преимущественно представлять собой белок, который действует как лиганд для определенного типа клеток, тем самым обеспечивая улучшенное связывание с клеткой-мишенью или повышая специфичность нацеливания вектора на конкретную популяцию клеток. Неродственный белок также может быть белком, который способствует очистке вирусной частицы как часть производственного процесса, то есть эпитопом или аффинной меткой. Место вставки будет выбрано так, чтобы не мешать другим функциям вирусной частицы, например, интернализации, переносу вирусной частицы. Специалист в данной области техники может определить подходящие сайты для вставки на основе общих знаний. Конкретные сайты раскрыты в Choi et al., упомянутом выше.

**[0123]** Изобретение дополнительно включает обеспечение последовательностей генома ААВ в порядке и конфигурации, отличных от порядка и конфигурации нативного генома ААВ. Изобретение также включает замену одной или более последовательностей или генов ААВ последовательностями другого вируса или химерными генами, состоящими из последовательностей более чем одного вируса. Такие химерные гены могут состоять из последовательностей двух или более родственных вирусных белков разных видов вирусов.

**[0124]** Векторы ААВ изобретения включают транкапсидированные формы, в которых геном или производное ААВ, имеющее ITR одного серотипа, упаковано в капсид другого серотипа. Векторы ААВ изобретения также включают мозаичные формы, в которых смесь немодифицированных белков капсида двух или более различных серотипов составляет вирусный капсид. Вектор ААВ может также включать химически модифицированные формы, несущие лиганды, адсорбированные на поверхности капсида. Например, такие лиганды могут включать антитела для нацеливания на конкретный рецептор клеточной поверхности.

**[0125]** Таким образом, например, векторы ААВ изобретения включают векторы с геномом ААВ2 и капсидными белками ААВ2 (ААВ2/2), векторы с геномом ААВ2 и капсидными белками ААВ5 (ААВ2/5) и векторы с геномом ААВ2 и капсидными белками ААВ8 (ААВ2/8). Вектор ААВ изобретения может содержать мутантный капсидный белок ААВ. В одном варианте осуществления вектор ААВ изобретения содержит мутантный капсидный белок ААВ8. Предпочтительно мутантный капсидный белок ААВ8 представляет собой капсидный белок ААВ8 Y733F.

**[0126]** Способы получения вирусных частиц ААВ в соответствии с настоящим изобретением будут известны специалисту в данной области техники. Примерный, но не ограничивающий способ получения вирусных частиц ААВ в соответствии с настоящим изобретением описан ниже. Для создания данного вектора ААВ требуются три плазмиды: одна, содержащая вирусный вектор для доставки, кодирующий интересующую последовательность нуклеиновой кислоты для доставки (т.е. последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую BEST1), плазида, кодирующая гены *rep* и *cap*, и третья вспомогательная плазида, которая содержит необходимые аденовирусные гены, необходимые для успешного создания ААВ. Промотор может быть функционально связан с каждым из генов упаковки. Конкретные примеры таких промоторов включают промоторы p5, p19 и p40 (Laughlin et al. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 5567-5571). Например, промоторы p5 и p19 обычно используют для экспрессии гена *her*, тогда как промотор p40 обычно используют для экспрессии гена *cap*. Плазмиды используются для трансфекции подходящих клеток, которые способны реплицировать вирусный вектор ААВ, транскрибировать и транслировать белок ААВ и упаковывать вирусный вектор ААВ в вирусную частицу ААВ. Примеры подходящих клеток включают клетки НЕК293. После трансфекции клетки собирают и

лизируют. Затем частицы ААВ можно очистить от лизата с помощью различных методов. В качестве альтернативы частицы ААВ можно очистить от супернатанта. Например, лизат можно обработать бензоназой и осветлить перед использованием градиента йодиксанола, состоящего из 15%, 25%, 40% и 60% фаз. Градиенты могут вращаться со скоростью 59 000 об/мин в течение 1 часа 30 минут, а затем 40% фракция удаляется. Затем эту фазу ААВ можно очистить и сконцентрировать с использованием фильтрующего устройства Amicon Ultra-15 100К.

#### *Фармацевтические композиции*

**[0127]** Векторы ААВ изобретения могут быть составлены в фармацевтические композиции. Эти композиции могут содержать, помимо лекарственного средства, фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель, вспомогательное вещество, буфер, стабилизатор или другие материалы, хорошо известные в данной области техники. Такие материалы должны быть нетоксичными и не должны влиять на эффективность активного ингредиента. Точная природа носителя или другого материала может быть определена специалистом в данной области техники в зависимости от пути введения, например, субретинальной, прямой ретинальной или интравитреальной инъекции.

**[0128]** Фармацевтическая композиция может быть составлена в виде жидкости. Жидкие фармацевтические композиции могут включать жидкий носитель, такой как вода, нефть, животные или растительные масла, минеральное масло или синтетическое масло. Могут быть включены физиологический солевой раствор, хлорид магния, декстроза или другой раствор сахаридов или гликоли, такие как этиленгликоль, пропиленгликоль или полиэтиленгликоль. В некоторых случаях может использоваться поверхностно-активное вещество, такое как плуроновая кислота (PF68) 0,001%.

**[0129]** Для инъекции в очаг поражения активный ингредиент может быть в форме водного раствора, который не содержит пирогенов и имеет подходящий рН, изотоничность и стабильность. Специалист в данной области техники может приготовить подходящие растворы, используя, например, изотонические носители, такие как хлорид натрия для инъекций, раствор Рингера или лактатный раствор Рингера для инъекции. При необходимости могут быть включены консерванты, стабилизаторы, буферы, антиоксиданты и/или другие добавки.

**[0130]** Буферы могут влиять на стабильность и биосовместимость вирусных векторов и векторных частиц в соответствии с настоящим изобретением после хранения и прохождения через устройства для инъекций для генной терапии ААВ. В некоторых вариантах осуществления вирусные векторы и векторные частицы в соответствии с настоящим изобретением могут быть разведены в буфере TMN 200 для поддержания биосовместимости и стабильности. Буфер TMN 200 содержит 20 мМ Трис (рН доведен до 8,0), 1 мМ MgCl<sub>2</sub> и 200 мМ NaCl.

**[0131]** Определение физического титра вирусного генома является частью характеристики вирусного вектора или вирусной частицы. В некоторых вариантах осуществления определение физического титра вирусного генома включает стадию обеспечения эффективности и безопасности вирусных векторов и вирусных частиц во время генной терапии. В некоторых вариантах осуществления способ определения титра ААВ включает количественную ПЦР (кПЦР). Существуют различные переменные, которые могут влиять на результаты, такие как конформация ДНК, используемая в качестве стандарта, или ферментативное расщепление во время подготовки образца. Вирусный вектор или препарат частиц, титр которых может быть измерен, можно сравнить со стандартной кривой разведения, полученной с использованием плазмиды. В некоторых вариантах осуществления плазмидная ДНК, используемая в стандартной кривой, находится в

конформации суперспирали. В некоторых вариантах осуществления плазмидная ДНК, используемая в стандартной кривой, находится в линейной конформации. Линеаризованную плазмиду можно получить, например, расщеплением ферментом рестриктазой *Hind* III, визуализацией с помощью электрофореза в агарозном геле и очисткой с использованием набора для экстракции геля QIAquick (Qiagen), следуя инструкциям производителя. Другие ферменты рестриктазы, которые расщепляют плазмиду, используемую для построения стандартной кривой, также могут быть подходящими. В некоторых вариантах осуществления использование суперспиральной плазмиды в качестве стандарта увеличивало титр вектора ААВ по сравнению с использованием линеаризованной плазмиды.

**[0132]** Чтобы извлечь ДНК из очищенных векторов ААВ для количественной оценки титра генома ААВ, можно использовать два ферментативных метода. В некоторых вариантах осуществления вектор ААВ может быть расщеплен отдельно ДНКазой I. В некоторых вариантах осуществления вектор ААВ может быть дважды расщеплен ДНКазой I и дополнительно обработан протеиназой K. Затем кПЦР можно проводить с помощью системы обнаружения ПЦР в реальном времени CFX Connect (BioRad) с использованием праймеров и зонда Taqman, специфичных для последовательности трансгена.

**[0133]** Для замедленного высвобождения лекарственное средство может быть включено в фармацевтическую композицию, которая составлена для медленного высвобождения, например, в микрокапсулах, образованных из биосовместимых полимеров, или в липосомальных системах-носителях в соответствии со способами, известными в данной области техники.

#### Дозировки

**[0134]** Используемый в данном документе термин «ДНК-резистентная частица (DRP)» относится к частицам ААВ, которые устойчивы к расщеплению ДНКазой, и поэтому считается, что они полностью инкапсулируют и защищают вектор ААВ в соответствии с настоящим изобретением от расщепления ДНКазой. Частицы ААВ также могут быть определены количественно с точки зрения общего количества геномных частиц (гч), вводимых в дозе, или гч/мл, количества геномных частиц на миллилитр (мл) раствора. Используемый в данном документе термин «геномная частица» (гч) относится к частицам ААВ, содержащим копию вектора доставки ААВ (или генома ААВ) в соответствии с настоящим изобретением. Используемый в данном документе термин «содержание генома» (GC) на мл относится к количеству вирусных геномов на мл раствора и может быть определен, например, с помощью кПЦР, как описано выше. Термины GC и VG (вирусные геномы) могут использоваться как синонимы для характеристики дозировок и концентраций ААВ в соответствии с настоящим изобретением.

**[0135]** В некоторых вариантах осуществления композиций в соответствии с настоящим изобретением композиция, содержащая вектор ААВ или вектор ААВ, вводится субъекту в виде разовой дозы.

**[0136]** В некоторых вариантах осуществления композиций в соответствии с настоящим изобретением композиция, содержащая вектор ААВ или вектор ААВ, может быть составлена в виде жидкой суспензии, в которой векторы ААВ суспендированы в фармацевтически приемлемом носителе. В некоторых вариантах осуществления изобретения композиции в соответствии с настоящим изобретением могут содержать множество векторов ААВ в концентрации  $1-2 \times 10^9$ ,  $1-2 \times 10^{10}$ ,  $1-2 \times 10^{11}$ ,  $1-2 \times 10^{12}$  или  $1-2 \times 10^{13}$  геномных частиц (гч) на мл. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения композиции в соответствии с настоящим изобретением могут содержать множество векторов ААВ в концентрации  $5 \times 10^{11}$  DRP/мл,  $1,5 \times 10^{12}$  DRP/мл,  $5 \times 10^{12}$  DRP/мл,  $1,2 \times 10^{12}$  DRP/мл,  $4,5 \times 10^{12}$  DRP/мл,  $1,2 \times 10^{13}$  DRP/мл,  $1,5 \times 10^{13}$  DRP/мл или  $5 \times 10^{13}$  DRP/ $1,2 \times 10^{12}$  DRP/мл. В некоторых вариантах осуществления композиции в соответствии с

настоящим изобретением могут содержать множество векторов ААВ в концентрации  $5 \times 10^{12}$  DRP на мл. В некоторых вариантах осуществления композиции в соответствии с настоящим изобретением могут содержать множество векторов ААВ в концентрации  $1,5 \times 10^{13}$  DRP на мл. Таким образом, чтобы ввести дозу вектора ААВ около  $2 \times 10^{10}$  гч, например, однократная инъекция около 10 мкл фармацевтической композиции, имеющая концентрацию около  $2 \times 10^{12}$  гч на мл, позволит достичь желаемой дозы *in vivo*.

**[0137]** В некоторых вариантах осуществления композиций в соответствии с настоящим изобретением композиция, содержащая вектор ААВ или вектор ААВ, может иметь объем от 1 до 500 мкл, включая конечные точки. В некоторых вариантах осуществления композиций в соответствии с настоящим изобретением композиция, содержащая вектор ААВ или вектор ААВ, может иметь объем от 10-500, 50-500, 100-500, 200-500, 300-500, 400-500, 50-250, 100-250, 200-250, 50-150, 1-100 или 1-10 мкл, включая конечные точки для каждого диапазона. В некоторых вариантах осуществления композиций в соответствии с настоящим изобретением композиция, содержащая вектор ААВ или вектор ААВ, может содержать объем 1, 2, 5, 10, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 мкл или любое количество микролитров между ними. В некоторых вариантах осуществления композиция, содержащая вектор ААВ или вектор ААВ, может содержать 100 мкл.

**[0138]** В некоторых вариантах осуществления композиций в соответствии с настоящим изобретением весь объем композиции, содержащей вектор ААВ или вектор ААВ, может быть введен за одну инъекцию. В некоторых вариантах осуществления часть объема композиции, содержащей вектор ААВ или вектор ААВ, может быть введена за одну инъекцию. В некоторых вариантах осуществления первая часть объема композиции, содержащей вектор ААВ или вектор ААВ, может быть введена при первой однократной инъекции, а вторая часть объема композиции, содержащей вектор ААВ или вектор ААВ, может быть введена при второй однократной инъекции.

**[0139]** В некоторых вариантах осуществления композиций в соответствии с настоящим изобретением композицию, содержащую вектор ААВ или вектор ААВ, вводят в дозировке, составляющей по меньшей мере  $2 \times 10^7$ ,  $2 \times 10^8$ ,  $5 \times 10^8$ ,  $1,5 \times 10^9$ ,  $2 \times 10^9$ ,  $5 \times 10^9$ ,  $2 \times 10^{10}$ ,  $5 \times 10^{10}$ ,  $6 \times 10^{10}$ ,  $1,2 \times 10^{11}$ ,  $2 \times 10^{11}$ ,  $4,5 \times 10^{11}$ ,  $5 \times 10^{11}$ ,  $1,2 \times 10^{12}$ ,  $1,5 \times 10^{12}$ ,  $2 \times 10^{12}$  или  $5 \times 10^{12}$  гч на глаз. В некоторых вариантах осуществления композицию, содержащую вектор ААВ или вектор ААВ, вводят в дозировке около  $5 \times 10^{10}$ ,  $1,5 \times 10^{11}$ ,  $5 \times 10^{11}$  или  $1,5 \times 10^{11}$  гч на глаз. В некоторых вариантах осуществления композицию, содержащую вектор ААВ или вектор ААВ, вводят в дозировке около  $5 \times 10^{11}$  DRP на глаз путем субретинальной инъекции. В некоторых вариантах осуществления композицию, содержащую вектор ААВ или вектор ААВ, вводят в дозировке около  $2 \times 10^{10}$  гч на глаз путем субретинальной инъекции. В некоторых вариантах осуществления композицию, содержащую вектор ААВ или вектор ААВ, вводят в дозировке около  $5 \times 10^{10}$  гч на глаз путем субретинальной инъекции. В некоторых вариантах осуществления вектор ААВ вводят в дозировке около  $6 \times 10^{10}$  гч на глаз путем субретинальной инъекции. В некоторых вариантах осуществления композицию, содержащую вектор ААВ или вектор ААВ, вводят в дозировке около  $1,5 \times 10^{11}$  гч на глаз путем субретинальной инъекции. В некоторых вариантах осуществления композицию, содержащую вектор ААВ или вектор ААВ, вводят в дозировке около  $2 \times 10^{11}$  гч на глаз путем субретинальной инъекции. В некоторых вариантах осуществления композицию, содержащую вектор ААВ или вектор ААВ, вводят в дозировке около  $5 \times 10^{11}$  гч на глаз путем субретинальной инъекции. В некоторых вариантах осуществления композицию, содержащую вектор ААВ или вектор ААВ, вводят в дозировке около  $1,5 \times 10^{12}$  гч на глаз путем субретинальной инъекции.

**[0140]** Дозировки или объемы могут быть рассчитаны на основе аллометрического масштабирования между видами на основе объема стекловидного тела. Используемый в данном документе термин

«аллометрия» относится к изменениям в организме в зависимости от размера тела. Некоторые факторы, которые следует учитывать при сравнении видов, включают объем тела, площадь поверхности, скорость метаболизма и уникальные анатомические, физиологические или биохимические процессы. Эквивалентная доза для человека может быть приведена к площади поверхности тела, массе тела или комбинации площади поверхности тела и массы тела. Также могут быть приняты во внимание другие факторы.

#### *Доставка*

**[0141]** Вирусные векторы по настоящему изобретению можно вводить в глаз субъекта путем субретинальной, прямой ретинальной, супрахориоидальной или интравитреальной инъекции. Специалист в данной области техники будет знаком с индивидуальными субретинальными, прямыми или интравитреальными инъекциями в сетчатку и сможет выполнять их.

**[0142]** Субретинальные инъекции представляют собой инъекции в субретинальное пространство, то есть под нейросенсорную сетчатку. Во время субретинальной инъекции вводимый материал направляется внутрь фоторецепторных клеток и слоев пигментного эпителия сетчатки (RPE) и создает пространство между ними. Когда инъекция проводится через небольшую ретиномию, может возникнуть отслоение сетчатки. Отслоившийся приподнятый слой сетчатки, который создается введенным материалом, называется «пузырь». Отверстие, создаваемое субретинальной инъекцией, должно быть достаточно маленьким, чтобы введенный раствор не возвращался обратно в полость стекловидного тела после введения. Такой рефлюкс будет особенно проблематичным при инъекции лекарства, потому что действие лекарства будет направлено в сторону от целевой зоны. Предпочтительно, чтобы инъекция создавала самоуплотняющуюся точку входа в нейросенсорную сетчатку, т.е. после того, как инъекционная игла удалена, отверстие, созданное иглой, закрывается так, что через отверстие выходит очень мало или практически не выходит впрыснутый материал.

**[0143]** Для облегчения этого процесса коммерчески доступны специальные иглы для субретинальных инъекций (например, тефлоновые иглы для субретинальных инъекций DORC 41G, Dutch Ophthalmic Research Center International BV, Zuidland, Нидерланды). Эти иглы предназначены для проведения субретинальных инъекций.

**[0144]** Альтернативно, субретинальные инъекции могут выполняться путем доставки композиции, содержащей частицы AAV, под прямым визуальным контролем с использованием операционного микроскопа (Leica Microsystems, Германия). Одним из примеров подхода является использование доступа через склеральный туннель через задний полюс к верхней сетчатке с помощью шприца Гамильтона и иглы 34-го размера (ESS labs, Великобритания). В качестве альтернативы, субретинальные инъекции могут выполняться с использованием парацентеза передней камеры с иглой 33G перед субретинальной инъекцией с использованием шприца WPI и системы игл 35G со скошенной кромкой (World Precision Instruments, Великобритания). Дополнительной альтернативой является шприц WPI Nanofil (WPI, кат. № NANOFIL) и игла WBI Nanofil 34 размера (WPI, кат. № NF34BL-2).

**[0145]** Векторы или композиции в соответствии с настоящим изобретением можно вводить с помощью супрахориоидальной инъекции. Любые средства супрахориоидальной инъекции рассматриваются как потенциальная система доставки для вектора или композиции в соответствии с настоящим изобретением. Супрахориоидальные инъекции представляют собой инъекции в супрахориоидальное пространство, которое представляет собой пространство между сосудистой оболочкой и склерой. Таким образом, инъекция в супрахориоидальное пространство является потенциальным путем введения для доставки композиций к

ближайшим структурам глаза, таким как сетчатка, пигментный эпителий сетчатки (RPE) или желтого пятна. В некоторых вариантах осуществления инъекция в супрахориоидальное пространство выполняется в переднюю часть глаза с помощью микроиглы, микроканюли или микрокатетера. Передняя часть глаза может включать или состоять из области впереди от экватора глаза. Композиция вектора или вирусные частицы AAV могут диффундировать назад от места инъекции супрахориоидальным путем. В некоторых вариантах осуществления изобретения в супрахориоидальное пространство заднего отдела глаза вводят инъекцию непосредственно с использованием катетерной системы. В этом варианте осуществления супрахориоидальное пространство может быть катетеризовано через разрез в плоской части ресничного тела. В некоторых вариантах осуществления инъекция или инфузия супрахориоидальным путем пересекает сосудистую оболочку, мембрану Бруха и/или слой RPE для доставки вектора или композиции в соответствии с настоящим изобретением в субретинальное пространство. В некоторых вариантах осуществления, включая те, в которых вектор или композиция в соответствии с настоящим изобретением доставляется в субретинальное пространство супрахориоидальным путем, производится одна или более инъекций по меньшей мере в одну из склеры, плоской части ресничного тела, сосудистой оболочки, мембраны Бруха и слоя RPE. В некоторых вариантах осуществления, включая те, в которых вектор или композиция в соответствии с настоящим изобретением доставляется в субретинальное пространство супрахориоидальным путем, используется двухэтапная процедура для создания пузырька в супрахориоидальном или субретинальном пространстве перед доставкой вектора или композиции в соответствии с настоящим изобретением.

**[0146]** В тех вариантах осуществления, где мышам вводят инъекцию, животных можно анестезировать путем внутрибрюшинной инъекции, содержащей кетамин (40-80 мг/кг) и ксилазин (1-10 мг/кг), и зрачки полностью расширить глазными каплями с тропикамидом (Mydriaticum 1%, Bausch & Lomb, Великобритания) и глазными каплями фенилэфрина (2,5% фенилэфрина гидрохлорид, Bausch & Lomb, Великобритания). Глазные капли с проксиметакаином (проксиметакаина гидрохлорид 0,5%, Bausch & Lomb, Великобритания) также можно наносить до субретинальной инъекции. После инъекции можно наносить глазные капли с хлорамфениколом (хлорамфеникол 0,5%, Bausch & Lomb, Великобритания) и отменять анестезию с помощью атипамезола (2 мг/кг) и геля карбомера (Viscotears, Novartis, Великобритания) для предотвращения образования катаракты.

**[0147]** Если во время инъекции не происходит повреждение сетчатки и пока используется достаточно маленькая игла, практически весь введенный материал остается локализованным между отслоившейся нейросенсорной сетчаткой и RPE в месте локализованного отслоения сетчатки (т.е. не происходит рефлюкса в полость стекловидного тела). Действительно, типичное сохранение пузыря в течение короткого периода времени указывает на то, что обычно происходит небольшой выход введенного материала в стекловидное тело. Пузырь может рассосаться в течение более длительного периода времени, поскольку впрыскиваемый материал впитывается.

**[0148]** Визуализацию глаза, в частности сетчатки, например, с помощью оптической когерентной томографии, можно выполнить до операции.

**[0149]** Векторы AAV по настоящему изобретению можно доставлять с повышенной точностью и безопасностью с помощью двухэтапного метода, в котором локализованная отслойка сетчатки создается субретинальной инъекцией первого раствора. Первый раствор не содержит вектора. Затем используется вторая субретинальная инъекция для доставки лекарственного средства, содержащего вектор, в субретинальную жидкость пузыря, созданного первой субретинальной инъекцией. Поскольку инъекция,

доставляющая лекарственное средство, не используется для отслоения сетчатки, на этом втором этапе может быть введен определенный объем раствора. Вектор AAB изобретения может быть доставлен: (а) введением раствора субъекту путем субретинальной инъекции в количестве, эффективном для по меньшей мере частичного отслоения сетчатки с образованием субретинального пузыря, при этом раствор не содержит вектор; и (b) введением лекарственной композиции путем субретинальной инъекции в пузырь, образованный на этапе (а), причем лекарственное средство включает вектор.

## ПРИМЕРЫ

### *Пример 1: Белок Бестрофин-1 в клетках HEK293 с использованием промотора CAG*

**[0150]** Клетки HEK293 трансдуцировали вектором AAB2/2, содержащим промотор CAG, управляющий экспрессией Best1, с WPRE (AAB2/2 CAG.BEST1.WPRE.pA, Фиг. 3) и без WPRE (AAB2/2 CAG.BEST1.pA), и исследовали экспрессию и локализацию белка Бестрофин-1. На Фиг. 6 трансдуцированные клетки HEK293 окрашивали Hoechst и антителом к Бестрофину-1 человека (hBEST1 или huBEST1). Белок Бестрофин-1 был обнаружен во всем цитозоле по сравнению с нетрансдуцированными контрольными клетками.

**[0151]** Экспрессию Бестрофина-1 в клетках HEK293 количественно определяли с помощью вестерн-блоттинга (Фиг. 7). На Фиг. 7A образец 1 представлял собой вектор AAB2/2 CAG.hBEST1.pA; образец 2 представлял собой вектор AAB2/2 CAG.hBEST1.WPRE.pA, а образец 3 представлял собой отрицательный контроль. Трансфицированные плазмидой клетки HEK293 использовали в качестве положительного контроля. На Фиг. 7B количественная оценка показала, что AAB2/2 CAG.BEST1.WPRE.pA (n = 9) продемонстрировал приблизительно 4-кратное увеличение экспрессии Бестрофина-1 по сравнению с AAB2/2 CAG.BEST1.pA (n = 9) (p < 0,01 по однофакторному дисперсионному анализу с тестом множественных сравнений Тьюки) и наблюдалось статистически значимое увеличение по сравнению с нетрансдуцированными контрольными клетками (n = 8) (p < 0,001). Хотя экспрессия Бестрофина-1 наблюдалась в клетках AAB2/2 CAG.BEST1.pA, это не было статистически значимым для нетрансдуцированных клеток. Планки погрешностей = ± СОС, и \*\*\* означает p < 0,001 по сравнению с нетрансдуцированным контролем.

**[0152]** Клетки HEK293, экспрессирующие Бестрофин-1, дополнительно анализировали с помощью записи фиксации потенциала целых клеток. На Фиг. 8A представлены графики зависимости тока (I)/напряжения (V) клеток HEK293, трансдуцированных векторами AAB2/2 CAG.BEST1.pA, AAB2/2 CAG.BEST1.WPRE.pA и AAB2/2 CAG.GFP.WPRE.pA, а также нетрансдуцированного контроля. На Фиг. 8B показаны формы кривой тока, а проводимость хорды показана на Фиг. 9.

### *Пример 2: Белок Бестрофин-1 в культивируемых клетках ARPE19 с использованием промотора VMD2*

**[0153]** Как известно, соответствующим образом дифференцированные ARPE19 имеют профили экспрессии генов, аналогичные профилям нативных клеток пигментного эпителия сетчатки (RPE), и могут использоваться в качестве альтернативы нативным клеткам RPE для тестирования экспрессии генов. Дифференцированные клетки ARPE19 использовали для проверки способности промоторов VMD2 и CAG управлять экспрессией BEST1 в клетках RPE и для проверки влияния последовательности интрон-экзон (IntEx) на экспрессию промотора VMD2.

**[0154]** Клетки ARPE19 трансфицировали и анализировали на экспрессию BEST1, используя протокол, представленный на Фиг. 10B. Клетки ARPE19 выращивали в среде для дифференцирования (DMEM с 4,5

г/л глюкозы, L-глутамином и 1 мМ пирувата натрия с добавлением 1% фетальной бычьей сыворотки (FBS) в течение 1-4 месяцев при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> в 96-луночных планшетах. Затем дифференцированные клетки ARPE19 трансфецировали pCAG.BEST1.WPRE (промотор CAG), pVMD.BEST1.WPRE (промотор VMD2) или pVMD2.IntEx.BEST1.WPRE (промотор VMD2 и конструкция интрон-экзон) в концентрации  $3,8 \times 10^{10}$  количества копий каждой плазмиды на лунку. Клетки, обработанные только реагентом TransIT-LT1, и клетки без реагента для трансфекции или плазмиды служили отрицательными контролями. Затем клетки культивировали в течение 2 суток при 37°C, а затем фиксировали и окрашивали анти-hBest1 и анти-ZO1 (также называемое ZO-1, или запирающая зона-1, или белок плотных контактов 1, белок, расположенный на цитоплазматической поверхности мембраны межклеточных плотных контактов). На Фиг. 11-13 показана экспрессия BEST1 в дифференцированных клетках ARPE19, трансфицированных тремя векторами, кодирующими BEST1, и нетрансфицированный контроль.

**[0155]** В клетках ARPE19, которые дифференцировались в течение одного месяца до трансфекции, нетрансфицированные клетки не показали экспрессии. Напротив, как pCAG.BEST1.WPRE, так и pVMD2.IntEx.BEST1.WPRE были способны управлять экспрессией белка BEST1 в дифференцированных клетках ARPE19 (см. Фиг. 11A, в отличие от первой, второй и четвертой строк). pVMD2.BEST1.WPRE (без экзона-интрона) также была способна управлять экспрессией BEST1 в 1-месячных дифференцированных клетках ARPE19 (Фиг. 11B), хотя эта конструкция, по-видимому, экспрессировала BEST1 на более низких уровнях, чем конструкция с последовательностью интрон-экзон. (pVMD2.IntEx.BEST1.WPRE). В клетках ARPE19, которые дифференцировались в течение трех месяцев, были получены аналогичные результаты: pCAG.BEST1.WPRE, pVMD2.IntEx.BEST1.WPRE и pVMD2.BEST1.WPRE были способны управлять экспрессией белка BEST1, хотя экспрессия с CAG промотором была выше, чем с промотором VMD2, а с промотором VMD2 последовательность интрон-экзон улучшает экспрессию (сравните первую строку на Фиг. 12A, нетрансфицированный контроль, с Фиг. 12B).

**[0156]** Клетки ARPE19 трансдуцировали и анализировали на экспрессию BEST1, используя протокол, представленный на Фиг. 10. Дифференцированные клетки ARPE19 перед трансдукцией предварительно обрабатывали 400 нМ доксорубицином. Было доказано, что это лекарственное средство улучшает эффективность трансдукции AAB2 на нескольких моделях *in vitro*. Через четыре часа после обработки клетки трансдуцировали различными вирусными конструкциями с разной множественностью инфекции (MOI).

**[0157]** ARPE19 клетки дифференцированные в течение 4 месяцев, предварительно обрабатывали 400 нМ доксорубицином и трансдуцировали AAB2/2.CAG.GFP.WPRE и AAB2/2.VMD2.InEx.GFP.WPRE при 2, 4 и  $8 \times 10^4$  гч/клетку показали более высокую флуоресценцию ЗФБ по сравнению с трансдуцированными клетками без предварительной обработки доксорубицином через 10 суток после трансдукции (сравните верхнюю и нижнюю строку каждой панели Фиг. 13A) AAB2/2.CAG.GFP.WPRE и B) AAB2/2.VMD2.InEx.GFP.WPRE). Флуоресценция ЗФБ не была обнаружена в нетрансдуцированных клетках, используемых в качестве отрицательного контроля (первый столбец на Фиг. 13A и B).

**[0158]** В клетках ARPE19, дифференцированных в течение 4 месяцев, предварительно обработанных 400 нМ доксорубицином и трансдуцированных AAB2/2.CAG.BEST1.WPRE и AAB2/2.VMD2.InEx.BEST1.WPRE в концентрации 1 и  $4 \times 10^4$  гч/клетку, экспрессию BEST1 можно было обнаружить путем иммуноокрашивания анти-hBEST1 (красный, третий столбец, вторая-пятая строки на Фиг. 14) по сравнению с нетрансдуцированным контролем (первая строка, Фиг. 14) через 10 суток после трансдукции.

**Пример 3: 4/8-недельное пилотное исследование *in vivo* на мышах**

**[0159]** Способность конструкций VMD2.BEST1.WPRE и VMD2.IntEx.BEST1.WPRE управлять экспрессией BEST1 исследовали *in vivo*. Протокол пилотного исследования *in vivo* в течение 4/8 недель показан на Фиг. 15. Мышам C57BL/6 (по 6 на группу) с двух сторон вводили имитационную инъекцию, вирусные частицы AAB AAB2/2 VMD2.BEST1.WPRE или AAB2/2 VMD2.IntEx.BEST1.WPRE. 1 мкл раствора AAB вводили субретинально с помощью иглы Nanofil 34 размера (WPI № NF34BL-2) из расчета  $1 \times 10^9$  GC/мкл/глаз. Глаза были визуализированы с использованием оптической когерентной томографии через 4 и 8 недель для оценки истончения сетчатки (токсичности), и 3 животных были умерщвлены в каждый момент времени для анализа экспрессии белка BEST1 с помощью иммуногистохимии и вестерн-блоттинга.

**[0160]** ОКТ-визуализация через 4 и 8 недель показала, что ни одна из конструкций VMD2 не проявляла фоторецепторной токсичности по сравнению с имитационным лечением (Фиг. 16-18).

**[0161]** Трех животных умерщвляли на 4- и 8-недельных моментах времени, и экспрессию белка BEST1 дополнительно охарактеризовали с помощью вестерн-блоттинга (Фиг. 21) и иммуногистохимии (Фиг. 19). На Фиг. 19 представлены результаты иммуногистохимии для глаз через четыре недели после инъекции, а на Фиг. 20 представлены результаты иммуногистохимии для глаз через восемь недель после инъекции. Глаза окрашивали анти-BEST1 (зеленый) и анти-родопсин (красный), которые маркируют фоторецепторные клетки, и DAPI (Фиг. 19 и 20). Экспрессия белка BEST1 наблюдалась в группах VMD2.BEST1.WPRE.pA и VMD2.IntEx.BEST1.WPRE.pA. Экспрессия BEST1, управляемая промотором VMD2, локализована на соединении слоя RPE и внешнего слоя фоторецептора. Вестерн-блоттинг на разрезанной ткани комплекса RPE/сосудистая оболочка из четырехнедельных инъекционных глаз показывает экспрессию белка (Фиг. 21).

**Пример 4: 4/13-недельное исследование для подтверждения концепции *in vivo* на мышах**

**[0162]** Дополнительные 4- и 13-недельные исследования *in vivo* для подтверждения концепции (PoC) были проведены на мышах для подтверждения результатов пилотного исследования, анализа влияния дозировки вирусных частиц AAB и изучения эффектов в более поздние моменты времени после инъекции AAB. Схема протокола для 4/13 недельного исследования для подтверждения концепции приведена на Фиг. 22. Мышам C57BL/6 (12 на когорту) с обеих сторон вводили частицы VMD2.IntEx.BEST1.WPRE или VMD2.BEST1.WPRE.pA AAB в концентрации  $1 \times 10^8$  GC/мкл/глаз или  $1 \times 10^9$  GC/мкл/глаз, или имитационную инъекцию. 1 мкл раствора AAB вводили субретинально с помощью иглы Nanofil 34 размера (WPI № NF34BL-2). Глаза были визуализированы с помощью ОКТ через 4 и 13 недель после инъекции. Четыре мыши были умерщвлены через четыре недели после инъекции, а оставшиеся восемь - через 13 недель после инъекции, и экспрессия BEST1 была охарактеризована с помощью иммуногистохимии и вестерн-блоттинга.

**[0163]** ОКТ-визуализация через 4 недели и 13 недель показала, что ни одна конструкция VMD2 (с интрон-экзонной последовательностью или без нее) ни в высокой дозе ( $1 \times 10^9$  GC/глаз), ни в низкой дозе ( $1 \times 10^8$  GC/глаз) не проявляла токсичности в виде истончения сетчатки по сравнению с имитационным контролем (Фиг. 23). Окрашивание анти-BEST1 (huBEST1 на Фиг. 24) и анти-родопсином показало, что управляемый VMD2 BEST1, локализован в слое RPE, с тенденцией к большей экспрессии BEST1 в глазах, инъекционных VMD2.IntEx.BEST1.WPRE. Вестерн-блоттинг на объединенной разрезанной ткани комплекса RPE/сосудистая оболочка из четырехнедельных инъекционных глаз (4) показывает экспрессию белка (Фиг. 25B).

**Пример 5: Исследование по оценке токсичности согласно надлежащей лабораторной практике (GLP) на мышах**

**[0164]** Безопасность и экспрессия BEST1 AAB в течение более длительных периодов времени проверяли на мышах с помощью исследования по оценке токсичности согласно надлежащей лабораторной практике (GLP) на мышах. Схема исследования представлена на Фиг. 27. Группам из 8 самцов и 8 самок мышей вводили субретинально и билатерально низкую ( $5,0 \times 10^8$  GC/глаз), среднюю ( $1,5 \times 10^9$  GC/глаз) или высокую ( $5,0 \times 10^9$  GC/глаз) дозы частиц AAB VMD2.IntEx.BEST1.WPRE. Используя масштабирование аллометрического объема, высокая доза для мышей эквивалентна дозе 100 мкл при  $5 \times 10^{12}$  GC/мл/глаз для человека. Мышей оценивали и умерщвляли через 4 и 26 недель. Глаза оценивали с помощью офтальмологического обследования, тонометрии для измерения внутриглазного давления (ВГД), ОКТ для определения толщины сетчатки (перед дозой и в конце 4 и 13 недель). После умерщвления, при вскрытии оценивали массу органов и ткани, такие как левый глаз, мозг, сердце, скелетные мышцы, легкие, печень, почки, семенники и яичник, собирали для количественной ПЦР. Проводили гистопатологические исследования, а ткани сохраняли, например, путем хранения в формалине, для дополнительной иммуногистохимии. Альтернативно или дополнительно группам из 4 мышей вводили дозы  $2 \times 10^9$  GC/глаз и  $5 \times 10^9$  GC/глаз частиц AAB VMD2.IntEx.BEST1.WPRE и оценивали через 4 недели для оптимизации протоколов для более масштабного исследования токсичности (см. схему на Фиг. 28).

#### **ВКЛЮЧЕНИЕ ПОСРЕДСТВОМ ССЫЛКИ**

**[0165]** Каждый документ, процитированный в данном документе, включая любые перекрестные ссылки или родственные патенты или заявки, настоящим включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте, если это явно не исключено или не ограничено иным образом. Цитирование любого документа не является признанием того, что он является предшествующим уровнем техники по отношению к любому изобретению, раскрытому или заявленному в данном документе, или что он сам по себе или в любой комбинации с любой другой ссылкой или ссылками представляет, предлагает или раскрывает любое такое изобретение. Кроме того, в той степени, в которой любое значение или определение термина в данном документе противоречит любому значению или определению того же термина в документе, включенном посредством ссылки, значение или определение, присвоенное этому термину в этом документе, имеет преимущественную силу.

#### **ДРУГИЕ ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ**

**[0166]** Хотя были проиллюстрированы и описаны конкретные варианты осуществления в соответствии с настоящим изобретением, могут быть выполнены различные другие изменения и модификации, не выходящие за рамки сущности и объема настоящего изобретения. Объем прилагаемой формулы изобретения включает все такие изменения и модификации, которые находятся в пределах объема настоящего изобретения.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция, содержащая:  
последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую:  
(a) последовательность, кодирующую промотор вителиформной макулярной дистрофии-2 (VMD2),  
и  
(b) последовательность, кодирующую белок Бестрофин-1 (BEST1).
2. Композиция по п. 1, отличающаяся тем, что последовательность, кодирующая промотор VMD2 кодирует промотор VMD2 человека.
3. Композиция по п. 1 или п. 2, отличающаяся тем, что последовательность, кодирующая белок BEST1 кодирует белок BEST1 человека.
4. Композиция по любому из пп. 1-3, отличающаяся тем, что последовательность, кодирующая белок BEST1 содержит кодирующую последовательность.
5. Композиция по любому из пп. 1-4, отличающаяся тем, что последовательность, кодирующая белок BEST1 содержит последовательность кДНК.
6. Композиция по любому из пп. 1-5, отличающаяся тем, что последовательность нуклеиновой кислоты дополнительно содержит:  
(c) последовательность, кодирующую посттранскрипционный регуляторный элемент (PRE).
7. Композиция по п. 6, отличающаяся тем, что последовательность, кодирующая PRE содержит последовательность, выделенную или полученную из вируса гепатита сурков (WPRE).
8. Композиция по любому из пп. 1-7, отличающаяся тем, что последовательность нуклеиновой кислоты дополнительно содержит:  
(d) последовательность, кодирующую сигнал полиаденилирования (полиА).
9. Композиция по любому из пп. 1-8, отличающаяся тем, что последовательность нуклеиновой кислоты дополнительно содержит:  
(e) последовательность, кодирующую 5'-нетранслируемую область.
10. Композиция по любому из пп. 1-8, отличающаяся тем, что последовательность нуклеиновой кислоты дополнительно содержит:  
(f) последовательность, кодирующую интрон, и  
(g) последовательность, кодирующую экзон,  
причем последовательность, кодирующая интрон, и последовательность, кодирующая экзон, являются функционально связанными.

11. Композиция по пп. 9 или 10, отличающаяся тем, что последовательность, кодирующая интрон, расположена между последовательностью, кодирующей промотор VMD2, и последовательностью, кодирующей экзон, причем последовательность, кодирующая экзон, расположена между последовательностью, кодирующей интрон, и последовательностью, кодирующей 5' нетранслируемую область (5' UTR), и при этом последовательность, кодирующая интрон, сплайсируется клеткой млекопитающего.
12. Композиция по любому из пп. 9-11, отличающаяся тем, что последовательность, кодирующая 5' UTR, содержит последовательность, кодирующую последовательность Козак или ее часть.
13. Композиция по п. 12, отличающаяся тем, что последовательность, кодирующая последовательность Козак, по меньшей мере на 50% идентична последовательности нуклеиновой кислоты GCCRCCATGG.
14. Композиция по п. 12, отличающаяся тем, что последовательность, кодирующая последовательность Козак содержит или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты GGCACCATGA.
15. Композиция по любому из пп. 2-14, отличающаяся тем, что последовательность, кодирующая промотор VMD2 человека, содержит или состоит из
- ```

1 AATTCTGTCA TTTTACTAGG GTGATGAAAT TCCCAAGCAA CACCATCCTT TTCAGATAAG
61 GGCACCTGAGG CTGAGAGAGG AGCTGAAACC TACCCGGGGT CACCACACAC AGGTGGCAAG
121 GCTGGGACCA GAAACCAGGA CTGTTGACTG CAGCCCGGTA TTCATTCTTT CCATAGCCCA
181 CAGGGCTGTC AAAGACCCCA GGGCCTAGTC AGAGGCTCCT CCTTCCTGGA GAGTTCCTGG
241 CACAGAAGTT GAAGCTCAGC ACAGCCCCCT AACCCCAAC TCTCTCTGCA AGGCCTCAGG
301 GGTCAAGAACA CTGGTGGAGC AGATCCTTTA GCCTCTGGAT TTTAGGGCCA TGGTAGAGGG
361 GGTGTTGCCC TAAATTCAG CCCTGGTCTC AGCCCAACAC CCTCCAAGAA GAAATTAGAG
421 GGGCCATGGC CAGGCTGTGC TAGCCGTTGC TTCTGAGCAG ATTACAAGAA GGGACTAAGA
481 CAAGGACTCC TTTGTGGAGG TCCTGGCTTA GGGAGTCAAG TGACGGCGGC TCAGCACTCA
541 CGTGGGCAGT GCCAGCCTCT AAGAGTGGGC AGGGGCACTG GCCACAGAGT CCCAGGGAGT
601 CCCACCAGCC TAGTCGCCAG ACC (SEQ ID NO: 1).

```
16. Композиция по любому из пп. 3-15, отличающаяся тем, что последовательность, кодирующая белок BEST1 человека, содержит или состоит из
- ```

1 ATGACCATCA CTTACACAAG CCAAGTGGCT AATGCCCGCT TAGGCTCCTT CTCCCGCCTG
61 CTGCTGTGCT GCGGGGCGAG CATCTACAAG CTGCTATATG GCGAGTTCTT AATCTTCCTG
121 CTCTGCTACT ACATCATCCG CTTTATTTAT AGGCTGGCCC TCACGGGAAGA ACAACAGCTG
181 ATGTTTGAGA AACTGACTCT GTATTGCGAC AGCTACATCC AGCTCATCCC CATTTCTTTC
241 GTGCTGGGCT TCTACGTGAC GCTGGTCTGT ACCCGCTGGT GGAACCAGTA CGAGAACCCTG
301 CCGTGGCCCG ACCGCCTCAT GAGCCTGGTG TCGGGCTTCG TCGAAGGCAA GGACGAGCAA
361 GGCCGGCTGC TGCGGCGCAC GCTCATCCGC TACGCCAAC TGGGCAACGT GCTCATCCTG
421 CGCAGCGTCA GCACCGCAGT CTAACAAGCGC TTCCCCAGCG CCCAGCACCT GGTGCAAGCA
481 GGCTTTATGA CTCGGGCAGA ACACAAGCAG TTGGAGAAAC TGAGCCTACC ACACAACATG
541 TTCTGGGTGC CCTGGGTGTG GTTTGCCAAC CTGTCAATGA AGGCGTGGCT TGGAGGTCGA

```

601 ATCCGGGACC STATCCTGCT CCAGAGCCTG CTGAACGAGA TGAACACCTT GCGTACTCAG  
 661 TGTGGACACC TGTATGCCTA CGACTGGATT AGTATCCCAC TGGTGTATAC ACAGGTGGTG  
 721 ACTGTGGCGG TGTACAGCTT CTTCTGACT TGTCTAGTTG GCGGCAGTT TCTGAACCCA  
 781 GCCAAGGCCT ACCCTGGCCA TGAGCTGGAC CTCGTTGTGC CCGTCTTCAC GTTCTGCAG  
 841 TTCTTCTTCT ATGTTGGCTG GCTGAAGGTG GCAGAGCAGC TCATCAACCC CTTTGGAGAG  
 901 GATGATGATG ATTTTGAGAC CAACTGGATT GTCGACAGGA ATTTGCAGGT GTCCCTGTTG  
 961 GCTGTGGATG AGATGCACCA GGACCTGCCT CGGATGGAGC CGGACATGTA CTGGAATAAG  
 1021 CCCGAGCCAC AGCCCCCCTA CACAGCTGCT TCCGCCCAGT TCCGTGAGC CTCCTTTATG  
 1081 GGCTCCACCT TCAACATCAG CCTGAACAAA GAGGAGATGG AGTTCAGCC CAATCAGGAG  
 1141 GACGAGGAGG ATGCTCACGC TGGCATCATT GGCCGCTTCC TAGGCCTGCA GTCCCATGAT  
 1201 CACCATCCTC CCAGGGCAAA CTCAAGGACC AAACACTGTG GGCCCAAGAG GGAATCCCTT  
 1261 CTCCACGAGG GCCTGCCCAA AAACCACAAG GCAGCCAAAC AGAACGTTAG GGGCCAGGAA  
 1321 GACAACAAGG CCTGGAAGCT TAAGGCTGTG GACGCCTTCA AGTCTGCCCC ACTGTATCAG  
 1381 AGGCCAGGCT ACTACAGTGC CCCACAGACG CCCCTCAGCC CCACTCCCAT GTTCTTCCCC  
 1441 CTAGAACCAT CAGCGCCGTC AAAGCTTCAC AGTGTACAG GCATAGACAC CAAAGACAAA  
 1501 AGCTTAAAGA CTGTGAGTTC TGGGGCCAAG AAAAGTTTTG AATTGCTCTC AGAGAGCGAT  
 1561 GGGGCSTTGA TGGAGCACCC AGAAGTATCT CAAGTGAGGA GGAAAACGTG GGAGTTTAAAC  
 1621 CTGACGGATA TGCCAGAGAT CCCCAGAAAAT CACCTCAAAG AACSTTTGGA ACAATCACCA  
 1681 ACCAACATAC ACACTACACT CAAAGATCAC ATGGATCCTT ATTGGGCCTT GGAAAACAGG  
 1741 GATGAAGCAC ATTCCTAA (SEQ ID NO: 3).

17. Композиция по любому из пп. 8-16, отличающаяся тем, что последовательность, кодирующая сигнал полиА содержит последовательность, выделенную или полученную из гена млекопитающего.
18. Композиция по п. 17, отличающаяся тем, что последовательность, кодирующая сигнал полиА содержит последовательность, выделенную или полученную из гена бычьего гормона роста (BGH).
19. Композиция по любому из пп. 10-18, отличающаяся тем, что последовательность, кодирующая экзон содержит последовательность, выделенную или полученную из гена млекопитающего.
20. Композиция по п. 19, отличающийся тем, что последовательность, кодирующая экзон содержит последовательность выделенную или полученную из гена бета-глобина кролика (*Oryctolagus cuniculus*).
21. Композиция по любому из пп. 10-20, отличающаяся тем, что последовательность, кодирующая интрон содержит не встречающуюся в природе последовательность.
22. Композиция по п. 21, отличающаяся тем, что последовательность, кодирующая интрон содержит последовательность слияния.
23. Композиция по п. 22, отличающаяся тем, что последовательность, кодирующая интрон, содержит последовательность, кодирующую сайт донора сплайсинга, и последовательность, кодирующую точку ветвления сплайсинга и акцепторный сайт.

24. Композиция по п. 23, отличающаяся тем, что последовательность, кодирующая сайт донора сплайсинга содержит последовательность, выделенную или полученную из гена позвоночных.
25. Композиция по п. 24, отличающаяся тем, что последовательность, кодирующая сайт донора сплайсинга содержит последовательность, выделенную или полученную из гена бета-актина (CBA) курицы (*Gallus gallus*).
26. Композиция по любому из пп. 23-25, отличающаяся тем, что последовательность, кодирующая точку ветвления сплайсинга и акцепторный сайт содержит последовательность, выделенную или полученную из гена позвоночных.
27. Композиция по п. 26, отличающаяся тем, что последовательность, кодирующая точку ветвления сплайсинга и акцепторный сайт содержит последовательность выделенную или полученную из гена бета-глобина кролика (*Oryctolagus cuniculus*).
28. Вектор, содержащий композицию по любому из пп. 1-27.
29. Вектор по п. 28, отличающийся тем, что вектор представляет собой плазмиду.
30. Вектор доставки, содержащий вектор по пп. 28 или 29.
31. Вектор доставки по п. 30, отличающийся тем, что вектор доставки представляет собой вирусный вектор доставки.
32. Вектор доставки по п. 31, отличающийся тем, что вектор доставки содержит одноцепочечный вирусный геном.
33. Вектор доставки по п. 31, отличающийся тем, что вектор доставки содержит двухцепочечный вирусный геном.
34. Вектор доставки по любому из пп. 30-33, отличающийся тем, что вектор доставки содержит молекулу РНК.
35. Вектор доставки по любому из пп. 30-34, отличающийся тем, что вектор доставки содержит последовательность, выделенную или полученную из вектора аденоассоциированного вируса (AAB).
36. Вектор доставки по п. 35, отличающийся тем, что вектор доставки содержит последовательность, выделенную или полученную из вектора AAB серотипа AAB1, AAB2, AAB3, AAB4, AAB5, AAB6, AAB7, AAB8, AAB9, AAB10, AAB11 или любой их комбинации.

37. Вектор доставки по п. 35, отличающийся тем, что вектор доставки содержит последовательность, выделенную или полученную из вектора AAB серотипа AAB2.
38. Вектор доставки по п. 35, отличающийся тем, что вектор доставки содержит последовательность, выделенную или полученную из вектора AAB серотипа AAB8.
39. Вектор доставки по пп. 37 или 38, отличающийся тем, что вектор доставки содержит последовательность, кодирующую первый инвертированный концевой повтор (ITR) и второй ITR, выделенный или полученный из вектора AAB серотипа AAB2, и последовательность, кодирующую вирусный ген выделенный или полученный из вектора AAB серотипа AAB2.
40. Вектор доставки по пп. 37 или 38, отличающийся тем, что вектор доставки содержит последовательность, кодирующую первый инвертированный концевой повтор (ITR) и второй ITR, выделенный или полученный из вектора AAB серотипа AAB8, и последовательность, кодирующую вирусный ген выделенный или полученный из вектора AAB серотипа AAB8.
41. Вектор доставки по п. 37 или 38, отличающийся тем, что вектор доставки содержит последовательность, кодирующую первый инвертированный концевой повтор (ITR) и второй ITR, выделенный или полученный из вектора AAB серотипа AAB2, и последовательность, кодирующую вирусный ген выделенный или полученный из вектора AAB серотипа AAB8.
42. Фармацевтическая композиция, содержащая композицию по любому из пп. 1-27 и фармацевтически приемлемый носитель.
43. Фармацевтическая композиция, содержащая вектор по пп. 28 или 29 и фармацевтически приемлемый носитель.
44. Фармацевтическая композиция, содержащая вектор доставки по любому из пп. 30-41 и фармацевтически приемлемый носитель.
45. Клетка, содержащая композицию по любому из пп. 1-27.
46. Клетка, содержащая вектор по пп. 28 или 29.
47. Клетка, содержащая вектор доставки по любому из пп. 30-41.
48. Клетка, содержащая фармацевтическую композицию по любому из пп. 42-44.
49. Клетка по любому из пп. 45-48, отличающаяся тем, что клетка представляет собой клетку млекопитающего.

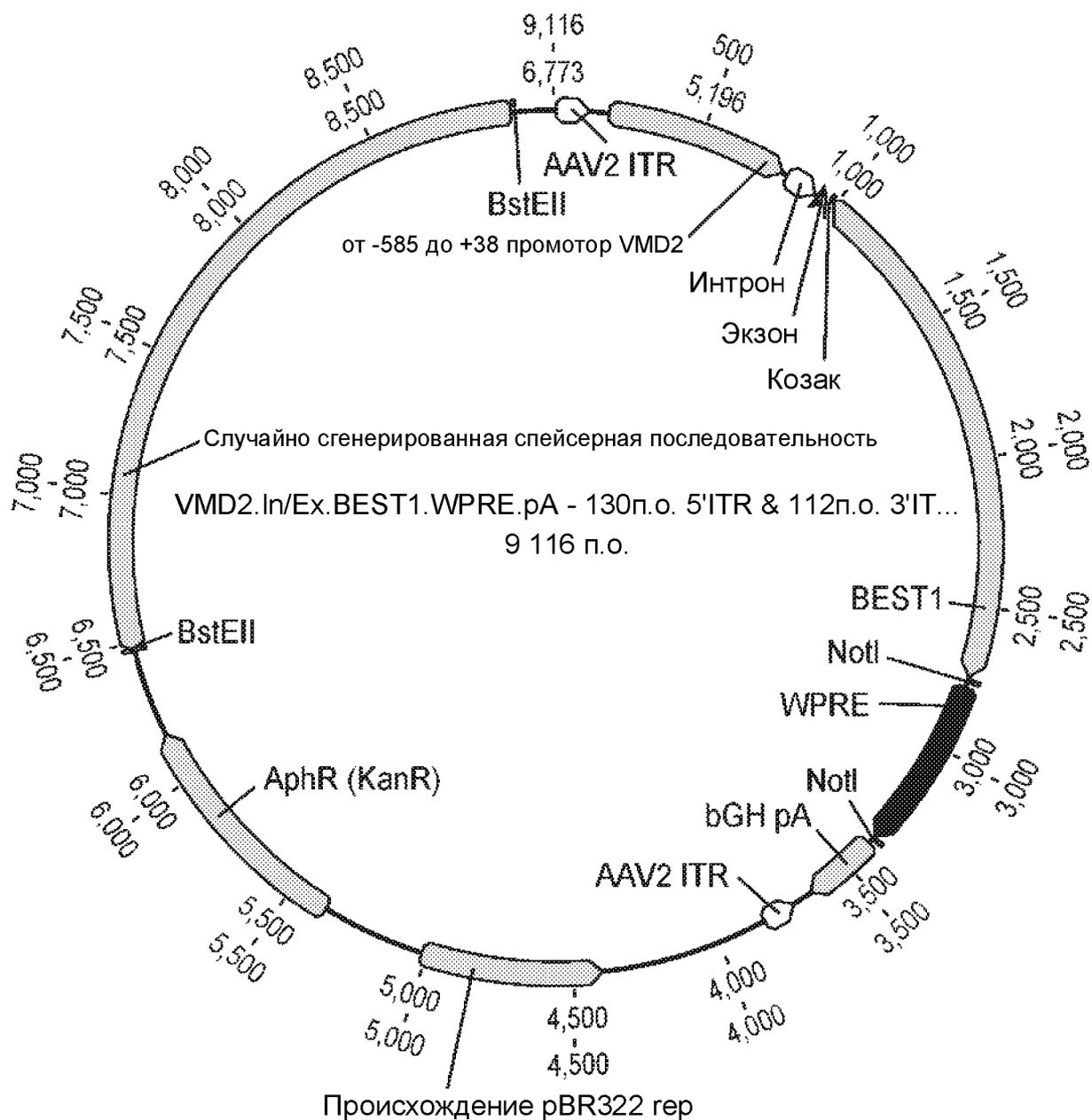
50. Клетка по п. 49, отличающаяся тем, что клетка млекопитающего представляет собой клетку приматов, отличных от человека, клетку грызунов, клетку мыши, клетку крысы или клетку кролика.
51. Клетка по любому из пп. 45-49, отличающаяся тем, что клетка представляет собой клетку человека.
52. Клетка по п. 51, отличающаяся тем, что клетка человека представляет собой нейрональную клетку, глиальную клетку, клетку сетчатки, фоторецепторную клетку, палочковидную клетку, колбочковидную клетку или кубовидную клетку пигментного эпителия сетчатки (RPE).
53. Клетка по п. 51, отличающаяся тем, что клетка человека представляет собой фоторецепторную клетку.
54. Клетка по п. 51, отличающаяся тем, что клетка человека представляет собой клетку HEK293 или клетку ARPE19.
55. Клетка по любому из пп. 51-53, отличающаяся тем, что клетка человека выделена или получена из RPE сетчатки человека.
56. Клетка по любому из пп. 51-55, отличающаяся тем, что клетка находится *in vivo*, *in vitro*, *ex vivo* или *in situ*.
57. Способ лечения макулярной дистрофии у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества композиции по любому из пп. 1-27 или пп. 42-44.
58. Способ лечения макулярной дистрофии у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества композиции, содержащей вектор по пп. 28 или 29.
59. Способ лечения макулярной дистрофии у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества композиции, содержащей вектор доставки по любому из пп. 30-41.
60. Способ по любому из пп. 57-59, отличающийся тем, что субъектом является человек.
61. Способ по любому из пп. 57-59, отличающийся тем, что субъектом является примат, отличный от человека, собака, кошка, грызун, мышь, крыса или кролик.
62. Способ по любому из пп. 57-61, отличающийся тем, что у субъекта имеется макулярная дистрофия.
63. Способ по любому из пп. 57-62, отличающийся тем, что субъект имеет мутацию в одной или обеих копиях гена BEST1.
64. Способ по п. 63, отличающийся тем, что мутация наследуется как доминантная мутация.

65. Способ по п. 64, отличающийся тем, что доминантная мутация вызывает у субъекта вителлиформную макулярную дистрофию Беста (BVMD).
66. Способ по п. 63, отличающийся тем, что мутация наследуется как рецессивная мутация.
67. Способ по п. 66, отличающийся тем, что рецессивная мутация вызывает у субъекта аутосомно-рецессивную бестрофинопатию (ARB).
68. Способ по любому из пп. 63-67, отличающийся тем, что мутация возникает в кодирующей последовательности одной или обеих копий гена BEST1.
69. Способ по любому из пп. 63-67, отличающийся тем, что мутация возникает в некодирующей последовательности одной или обеих копий гена BEST1.
70. Способ по любому из пп. 57-69, отличающийся тем, что введение включает инъекцию или инфузию субретинальным, супрахориоидальным или интравитреальным путем.
71. Способ по любому из пп. 57-69, отличающийся тем, что введение включает инъекцию или инфузию субретинальным путем.
72. Способ по п. 71, отличающийся тем, что введение включает двухэтапную инъекцию или двухэтапную инфузию субретинальным путем.
73. Способ по любому из пп. 57-72, отличающийся тем, что терапевтически эффективное количество составлено в объеме от 10 до 200 мкл, включая конечные точки.
74. Способ по п. 73, отличающийся тем, что терапевтически эффективное количество составлено в объеме от 10 до 50 мкл, от 50 до 100 мкл, от 100 до 150 мкл или от 150 до 200 мкл, включая конечные точки для каждого диапазона.
75. Способ по любому из пп. 57-72, отличающийся тем, что терапевтически эффективное количество составлено в объеме от 70 до 120 мкл, включая конечные точки, и причем введение включает инъекцию или инфузию субретинальным путем.
76. Способ по любому из пп. 57-72, отличающийся тем, что терапевтически эффективное количество составлено в объеме 100 мкл, и причем введение включает инъекцию или инфузию субретинальным путем.
77. Способ по любому из пп. 59-76, отличающийся тем, что терапевтически эффективное количество содержит концентрацию вектора доставки AAV по меньшей мере  $1 \times 10^{10}$  устойчивых к ДНКазе частиц (DRP)/мл, по меньшей мере  $1 \times 10^{11}$  DRP/мл, по меньшей мере  $1 \times 10^{12}$  DRP/мл, по меньшей мере  $2 \times 10^{12}$  DRP/мл, по меньшей мере  $5 \times 10^{12}$  DRP/мл или по меньшей мере  $1,5 \times 10^{13}$  DRP/мл.

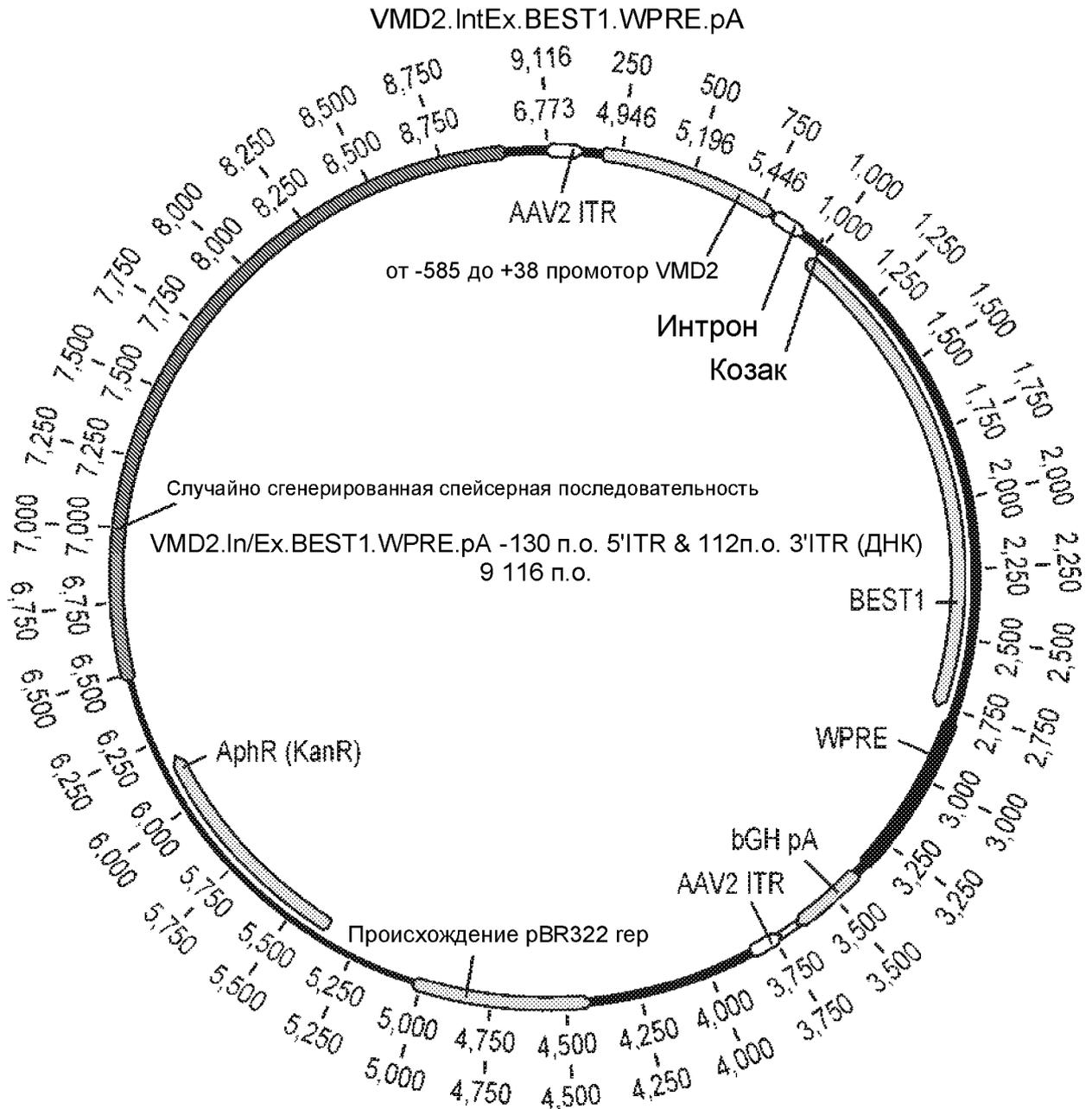
78. Способ по любому из пп. 59-76, отличающийся тем, что терапевтически эффективное количество содержит концентрацию вектора доставки ААВ по меньшей мере  $2 \times 10^{12}$  DRP/мл, по меньшей мере  $5 \times 10^{12}$  DRP/мл или по меньшей мере  $1,5 \times 10^{13}$  DRP/мл.
79. Способ по любому из пп. 59-76, отличающийся тем, что терапевтически эффективное количество содержит концентрацию вектора доставки ААВ по меньшей мере  $5 \times 10^{12}$  DRP/мл.
80. Способ по любому из пп. 59-76, отличающийся тем, что терапевтически эффективное количество содержит концентрацию вектора доставки ААВ по меньшей мере  $1,5 \times 10^{13}$  DRP/мл.
81. Способ по любому из пп. 59-80, отличающийся тем, что терапевтически эффективное количество содержит дозу  $2 \times 10^8$  геномных частиц (гч),  $5 \times 10^8$  гч,  $1,5 \times 10^9$  гч,  $2 \times 10^9$  гч,  $5 \times 10^9$  гч,  $2 \times 10^{10}$  гч,  $5 \times 10^{10}$  гч,  $6 \times 10^{10}$  гч,  $1,2 \times 10^{11}$  гч,  $1,5 \times 10^{11}$  гч,  $2 \times 10^{11}$  гч,  $4,5 \times 10^{11}$  гч,  $5 \times 10^{11}$  гч,  $1,2 \times 10^{12}$  гч,  $1,5 \times 10^{12}$  гч,  $2 \times 10^{12}$  гч или  $5 \times 10^{12}$  гч.
82. Способ по любому из пп. 59-80, отличающийся тем, что субъект представляет собой мышь и причем терапевтически эффективное количество содержит дозу  $5 \times 10^8$  гч,  $1,5 \times 10^9$  гч или  $5 \times 10^9$  гч.
83. Способ по любому из пп. 59-80, отличающийся тем, что субъект представляет собой примата, отличного от человека, и причем терапевтически эффективное количество содержит дозу частиц вируса ААВ  $1,2 \times 10^{11}$  гч,  $4,5 \times 10^{11}$  гч или  $1,2 \times 10^{12}$  гч.
84. Способ по любому из пп. 59-80, отличающийся тем, что субъект представляет собой человека, и причем терапевтически эффективное количество содержит дозу частиц вируса ААВ  $5 \times 10^{10}$  гч,  $1,5 \times 10^{11}$  гч,  $5 \times 10^{11}$  гч или  $1,5 \times 10^{12}$  гч.
85. Способ по любому из пп. 57-84, отличающийся тем, что композиция дополнительно содержит буфер TMN200.

## ФИГ. 1А

VMD2.IntEx.BEST1.WPRE.pA

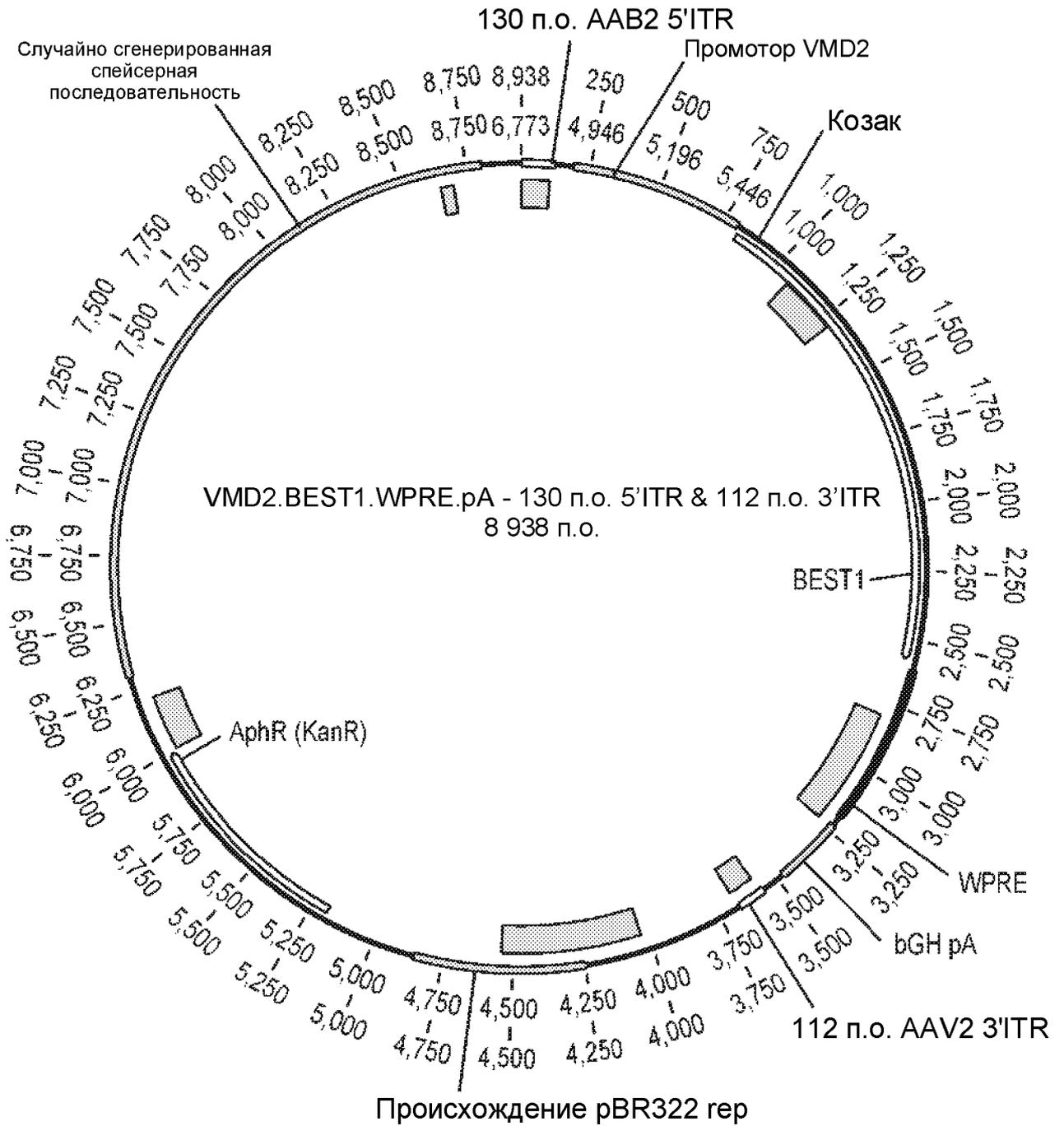


ФИГ. 1В



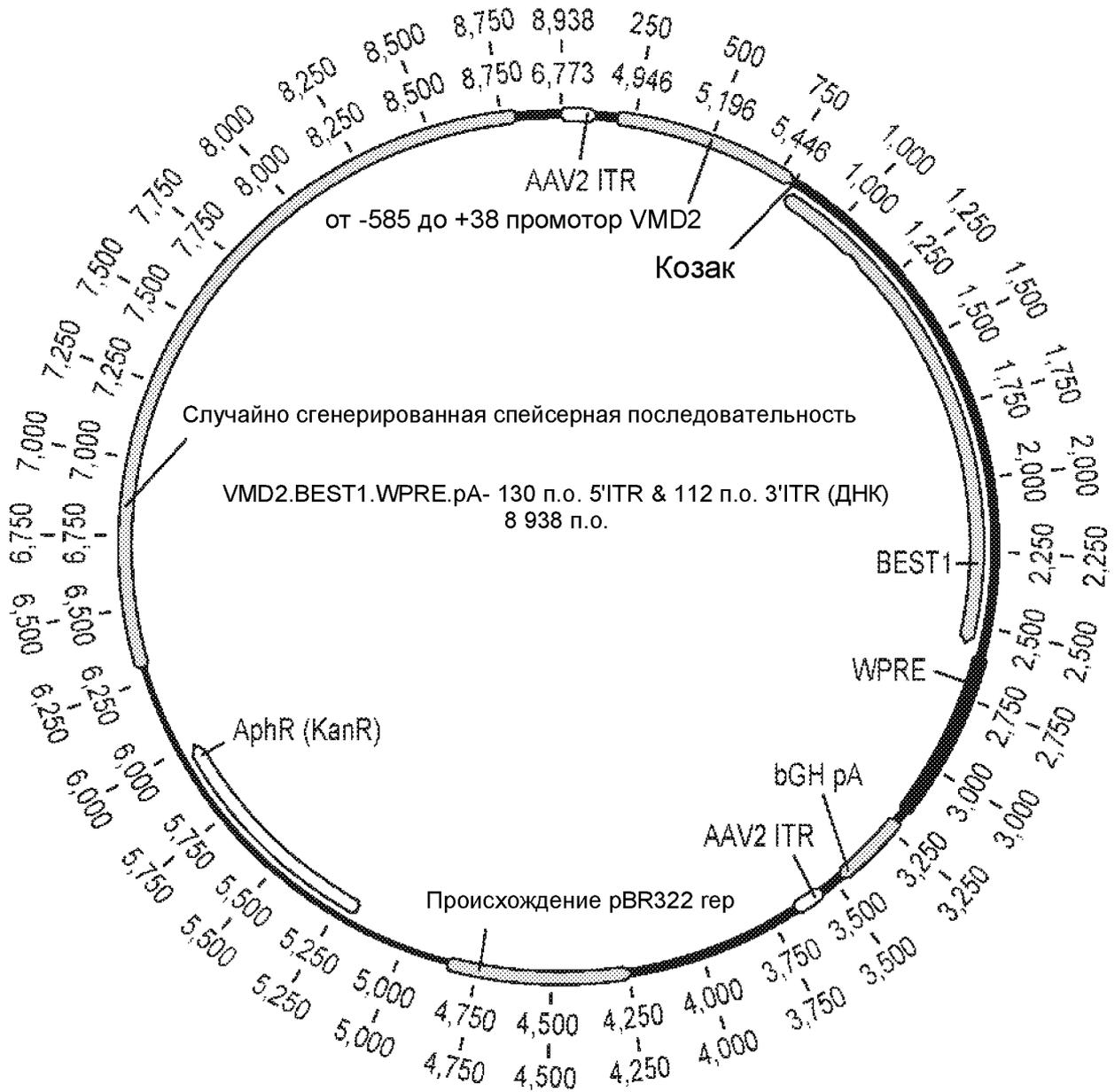
ФИГ. 2А

VMD2.BEST1.WPRE.pA



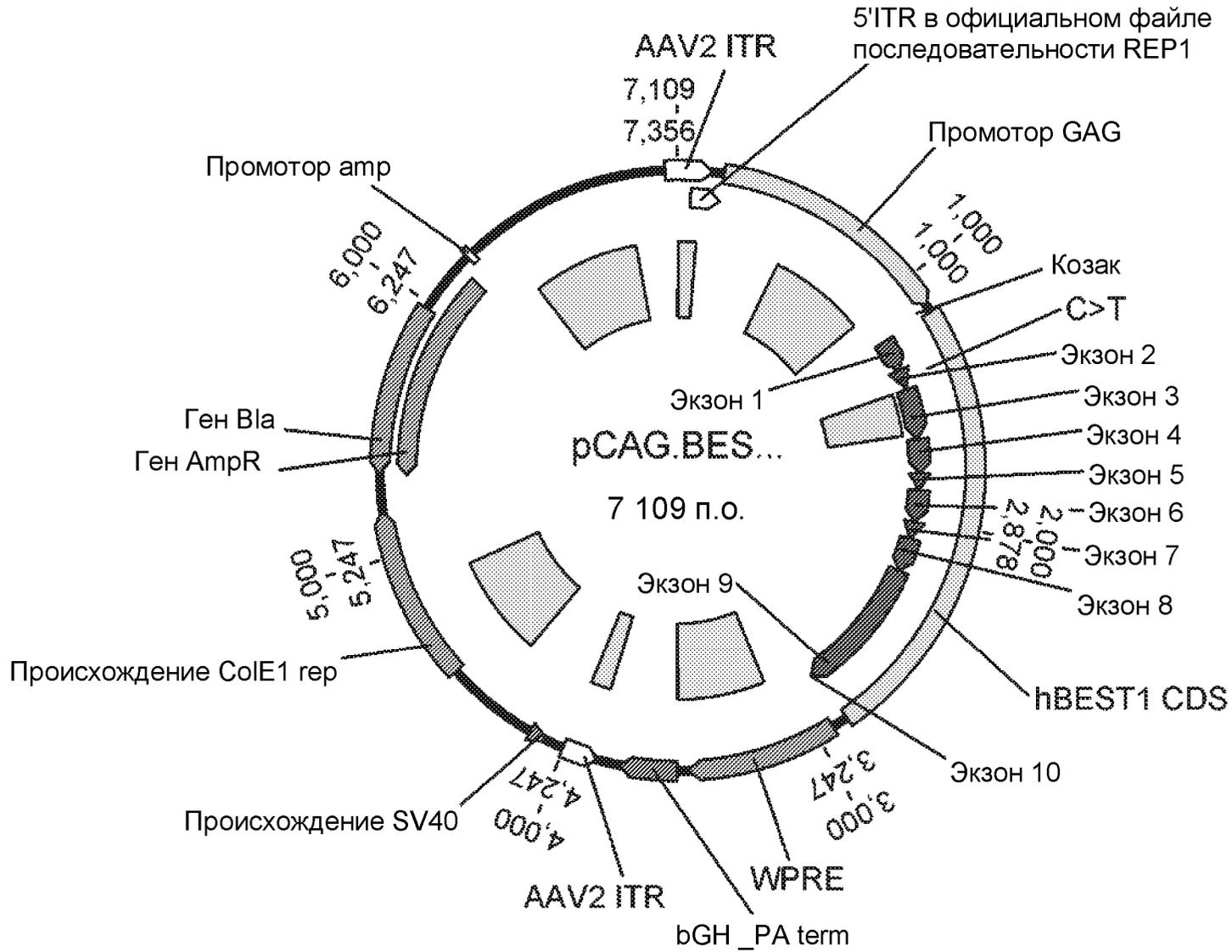
## ФИГ. 2В

VMD2.BEST1.WPRE.pA



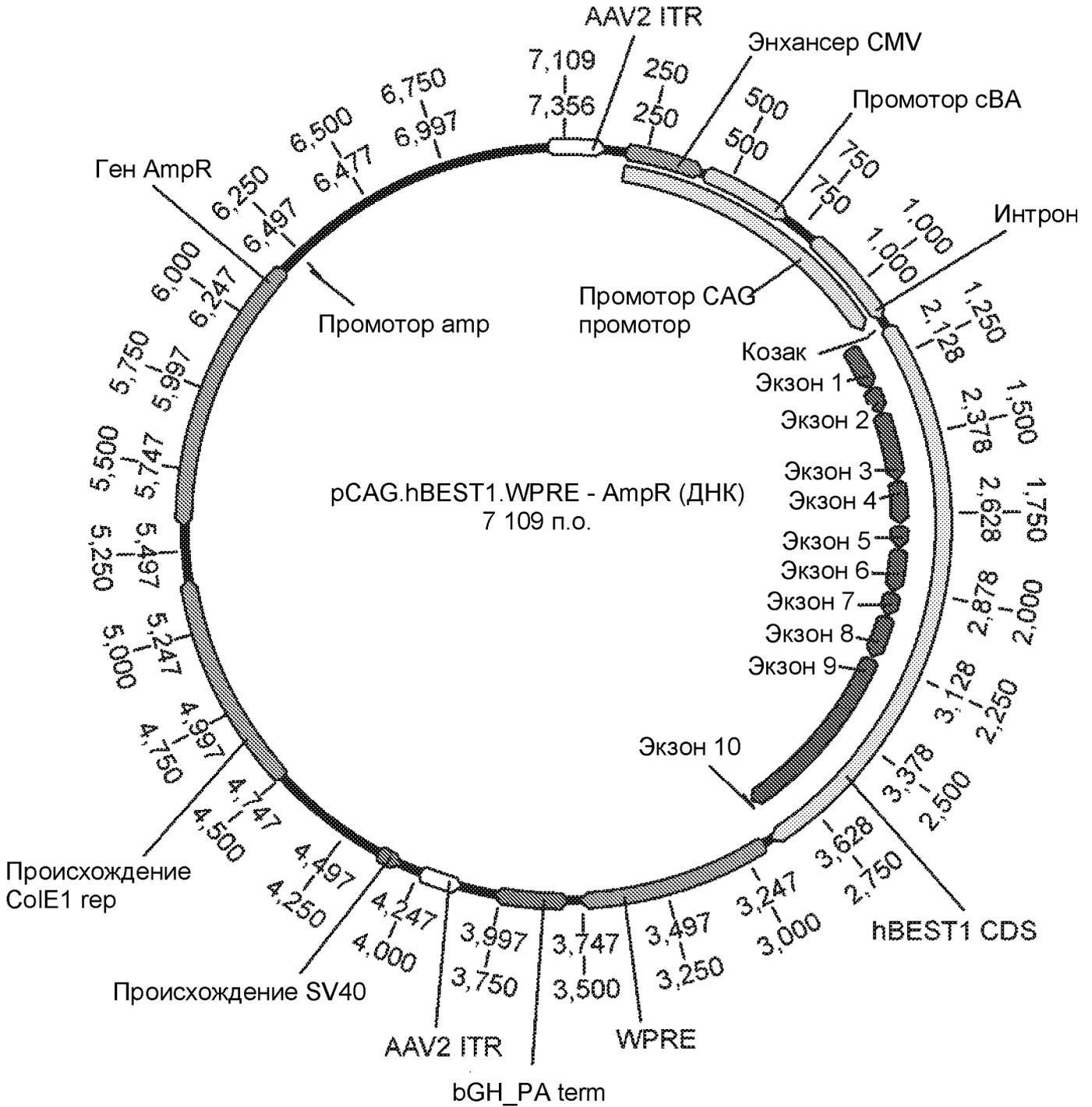
ФИГ. 3А

CAG.BEST1.WPRE.pA



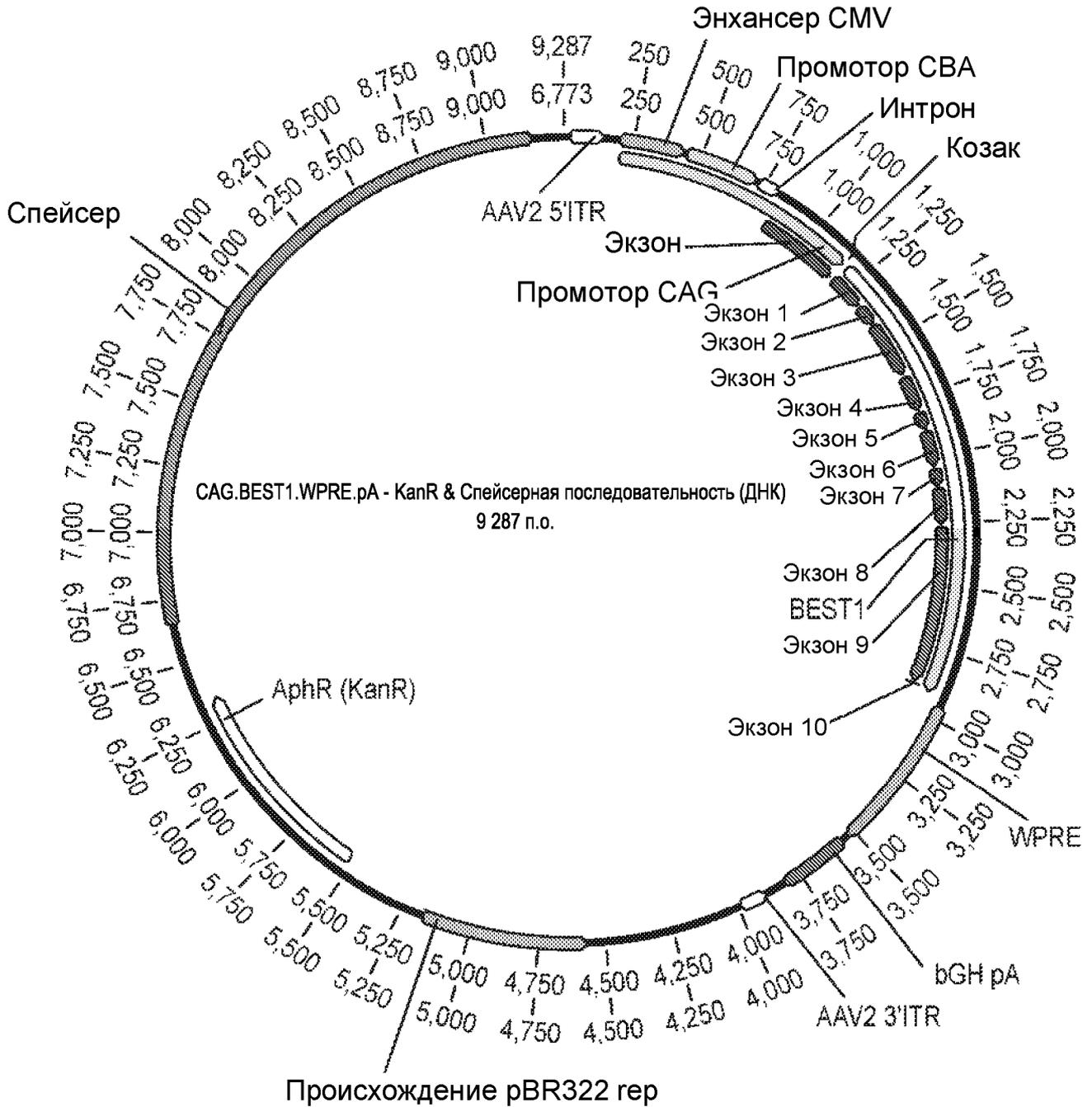
ФИГ. 3В

CAG.BEST1.WPRE.pA



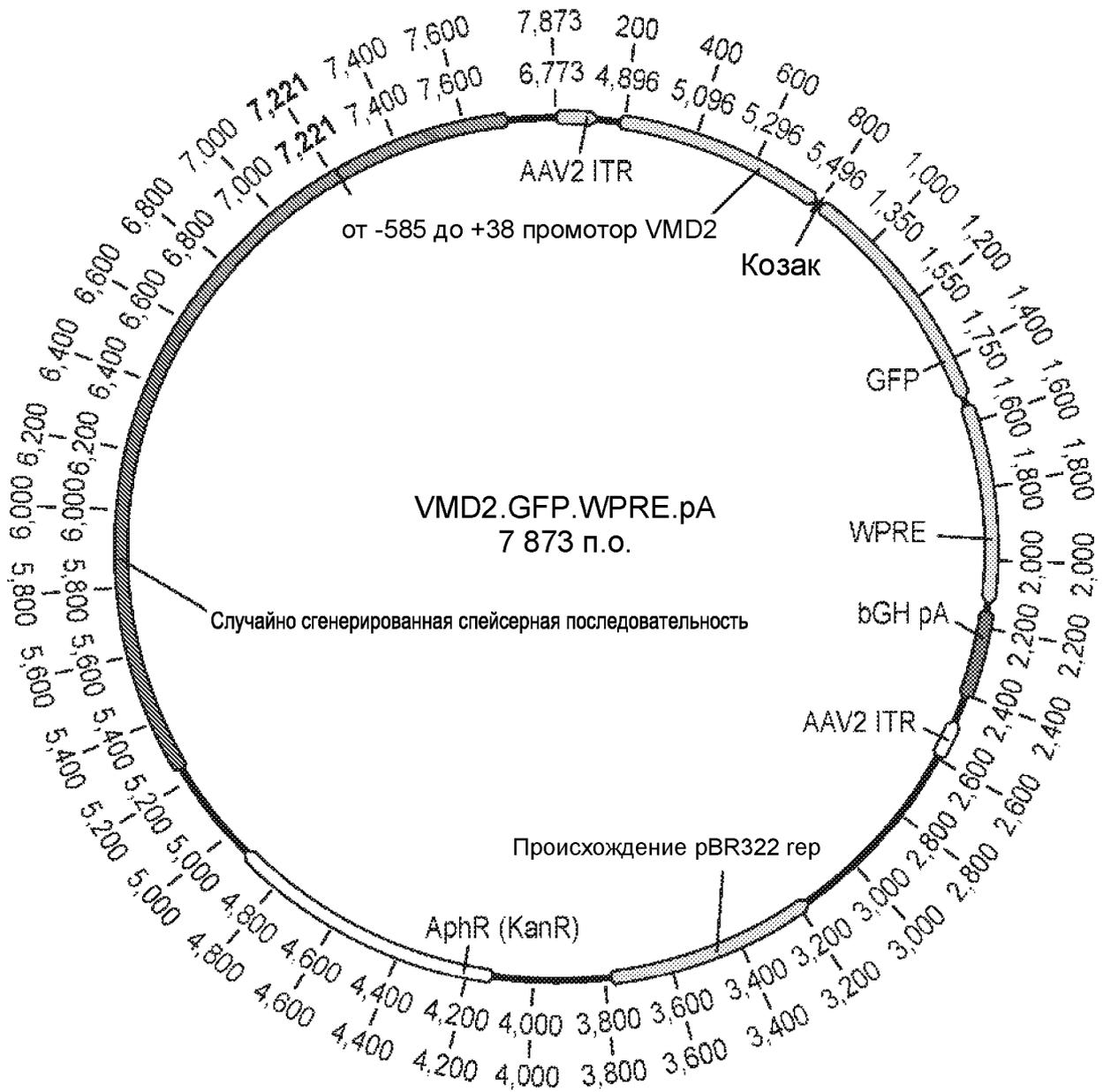
## ФИГ. 3С

GAG.BEST1.WPRE.pA с KanR и Спейсерной последовательностью



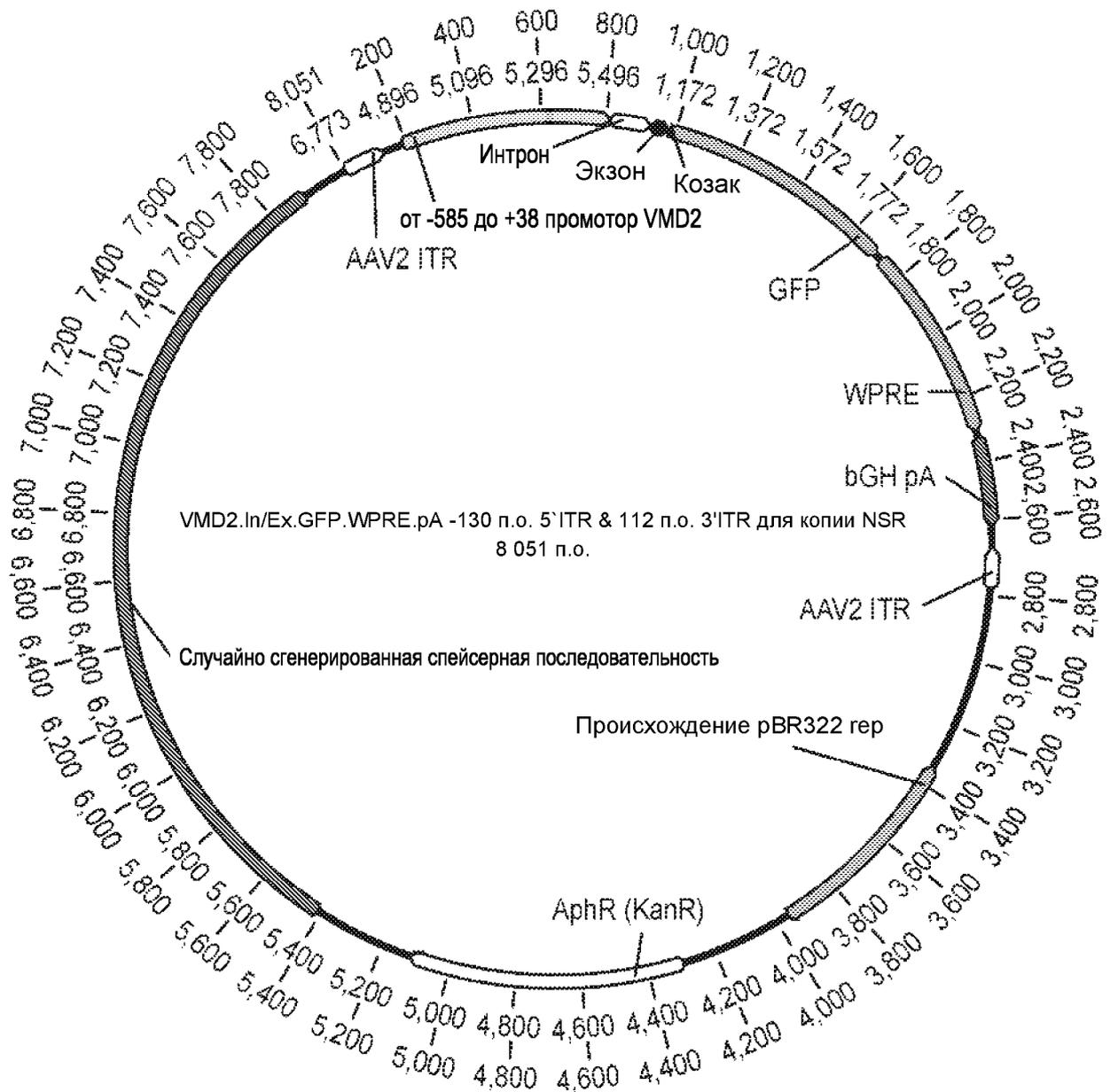
## ФИГ. 4

Карта плазмиды VMD2.GFP.WPRE.pA



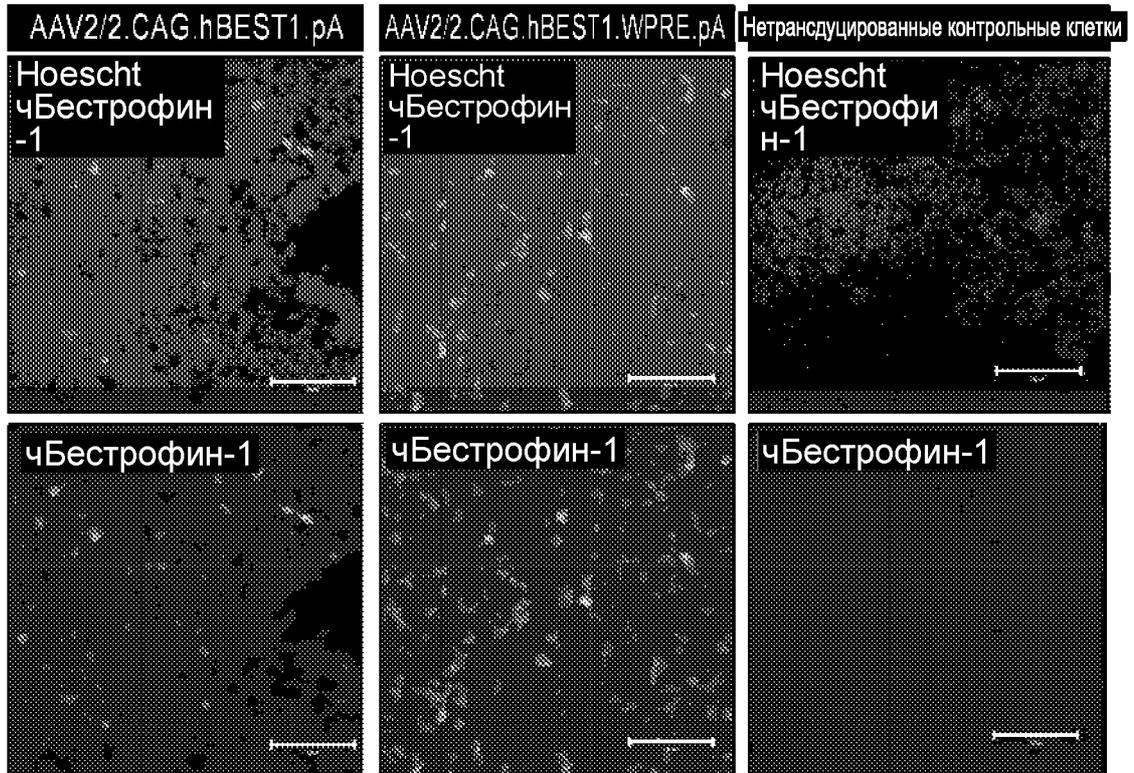
## ФИГ. 5

Карта плазмиды VMD2.IntEx.GFP.WPRE.pA

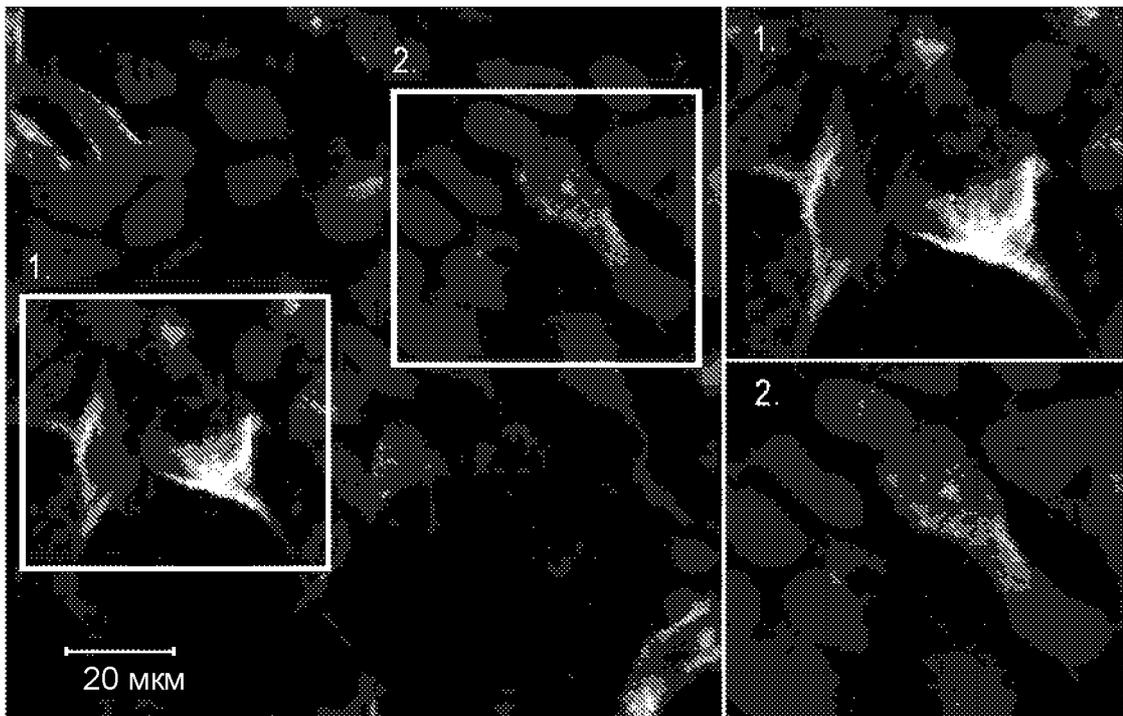


## ФИГ. 6А

Локализация Бестрофина-1 в клетках HEK-293 после  
трансдукции AAV-CAG-BEST1

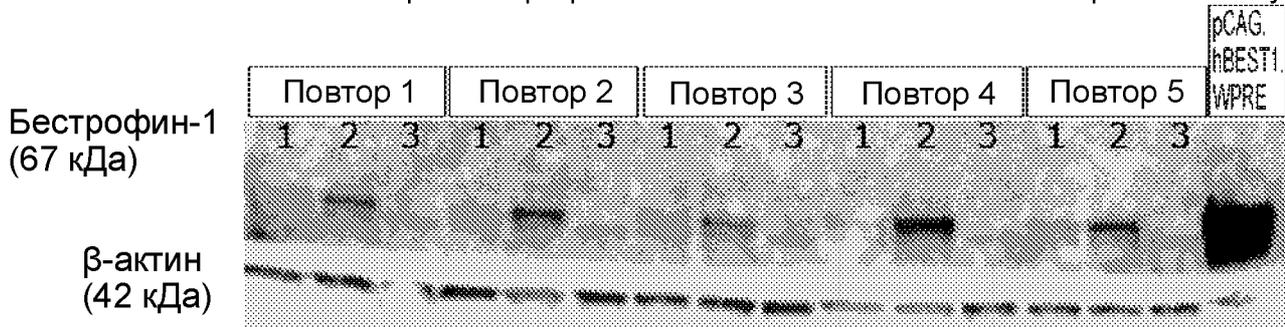


## ФИГ. 6В

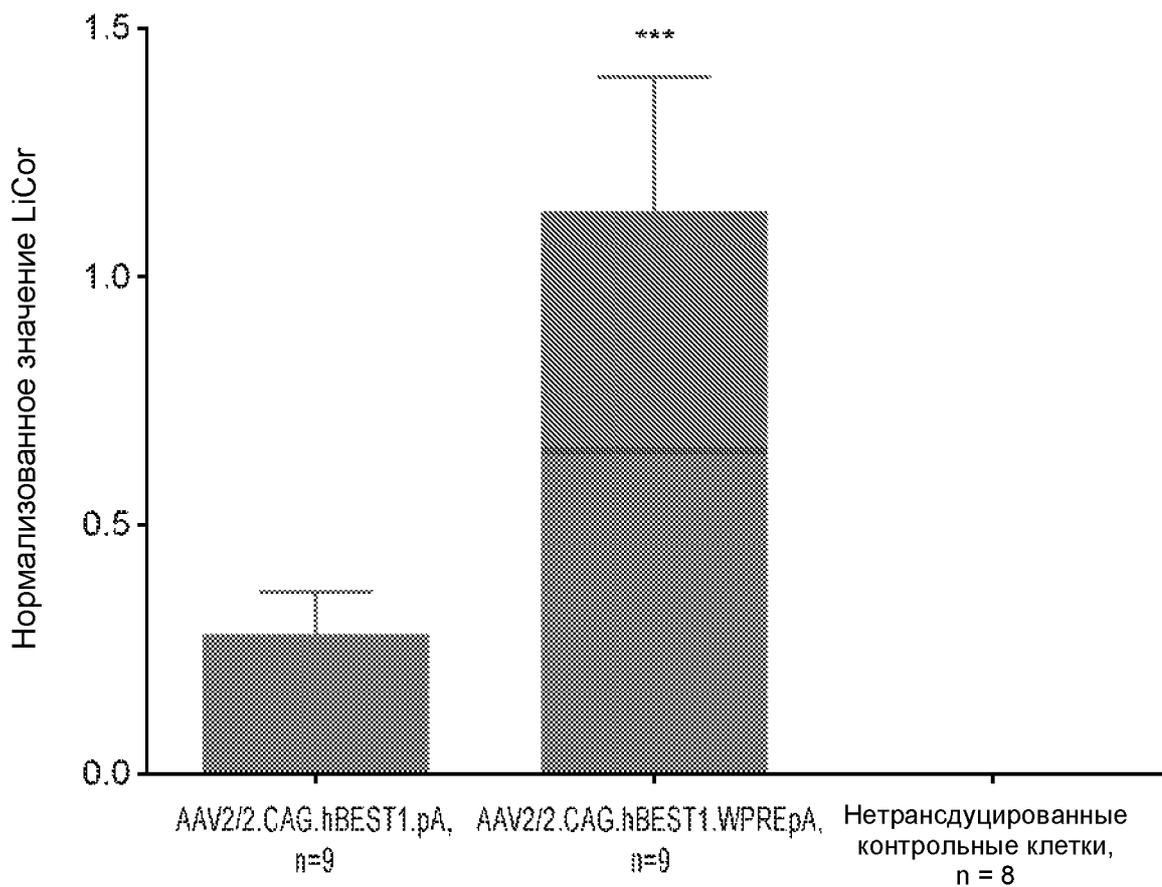


ФИГ. 7А

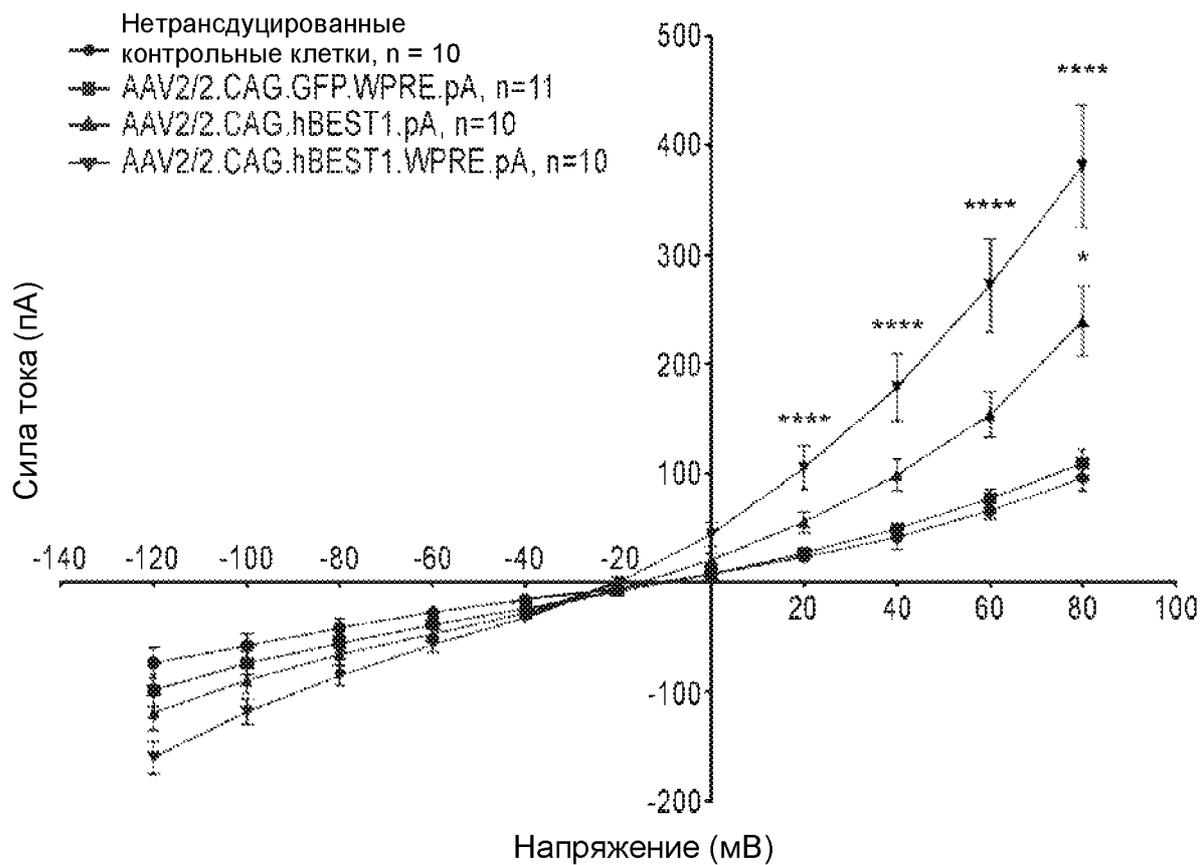
Локализация Бестрофина-1 в клетках НЕК-293 по вестерн-блоттингу



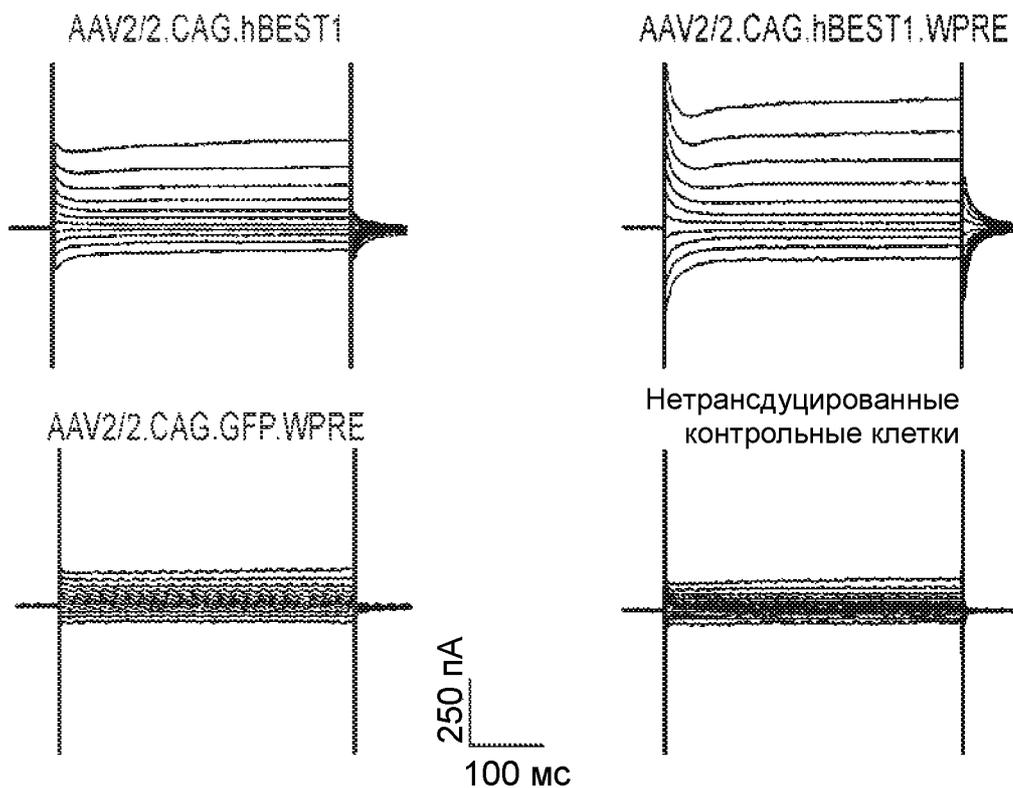
ФИГ. 7В



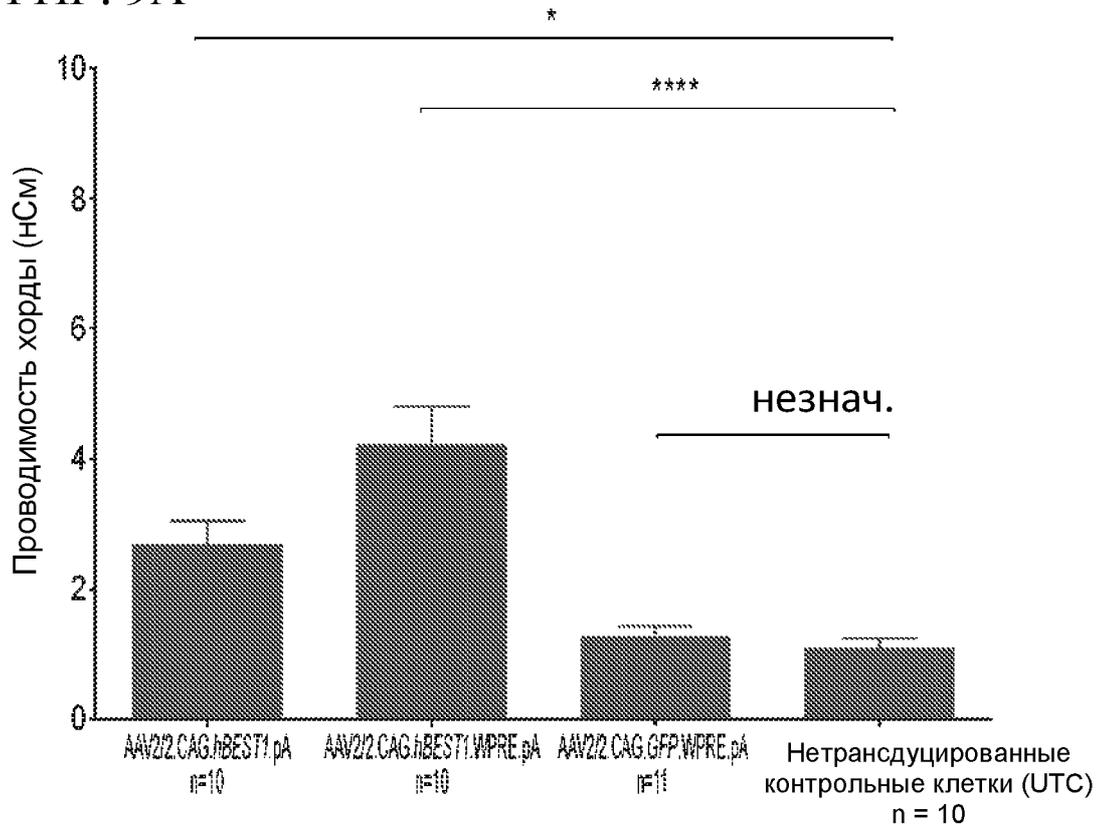
ФИГ. 8А



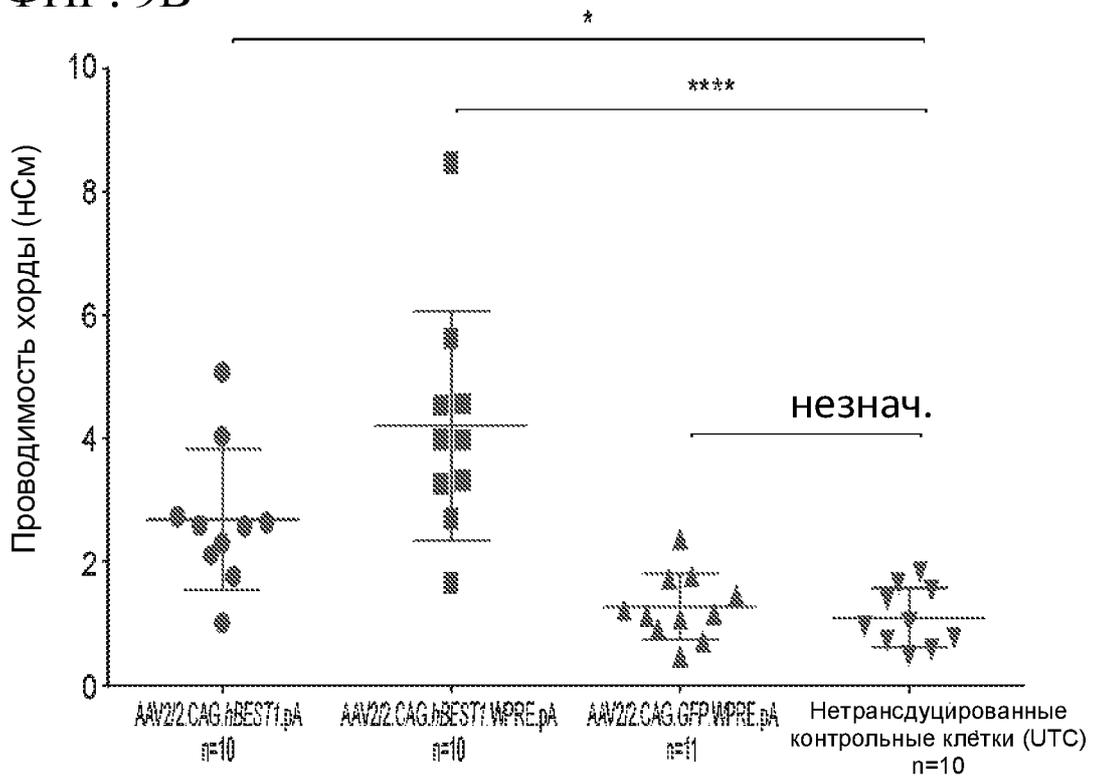
ФИГ. 8В



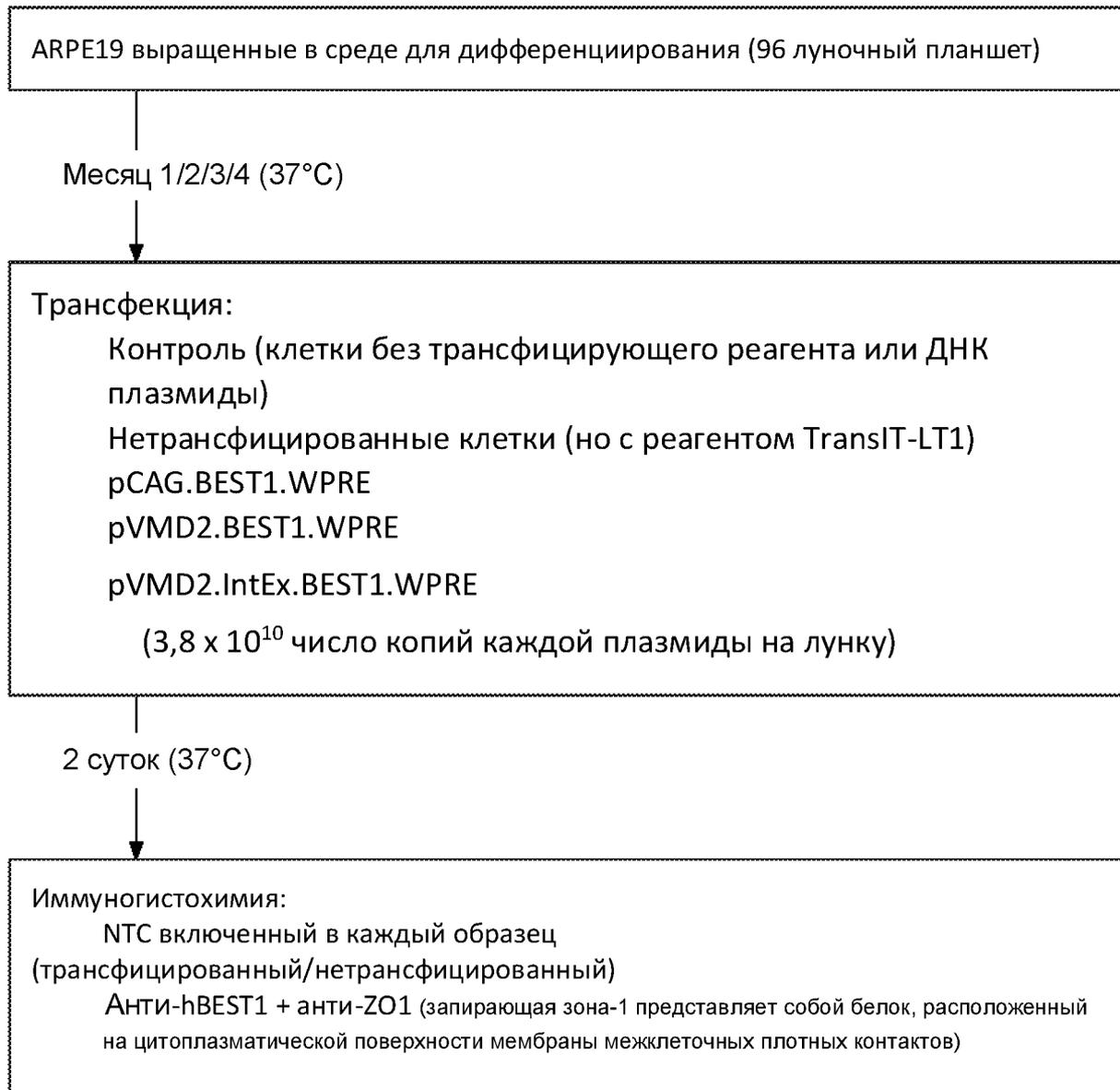
ФИГ. 9А



ФИГ. 9В



## ФИГ. 10А

**Экспериментальная процедура**

ФИГ. 10В

ARPE19 (ATCC® CRL-2302™), количество пересевов 9-15

Условия культивирования клеток

- Высевание на 96-луночные микропланшеты Primaria™
- Выращивание в дифференцирующей среде: DMEM с 4,5 г/л глюкозы, 4 mM L-глутамина и 1 mM пирувата натрия с добавкой 1% ФБС и пенициллина (100 ед/мл) и стрептомицина (100 мкг/мл)
- Выдерживание при 37 °С во влажной окружающей среде при 5% CO<sub>2</sub> в течение до 4 месяцев, со сменой среды каждые 5 дней

Трансфекция:

3,8 x 10<sup>10</sup> число копий:

pCAG.BEST1.WPRE  
pVMD2.BEST1.WPRE  
pVMD2.InEx.BEST1.WPRE

Трансдукция

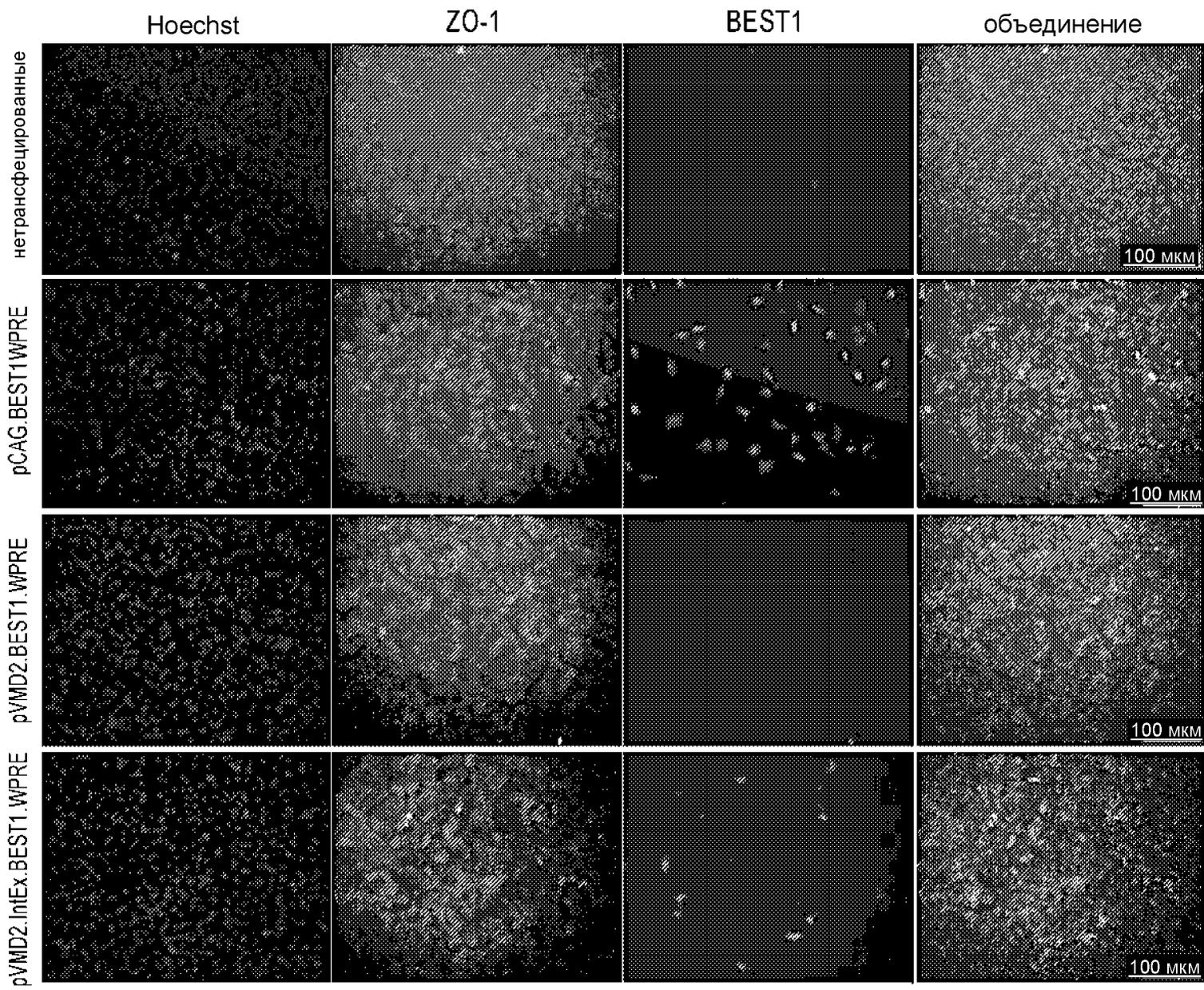
Клетки предварительно обработанные 400 нМ доксорубицина в течение 4 ч, 10000 гч/клетку каждого вируса добавляли к клеткам:  
AAB2/2.CAG.BEST1.WPRE  
AAB2/2.VMD2.InEx.BEST1.WPRE

48 ч при 37°С

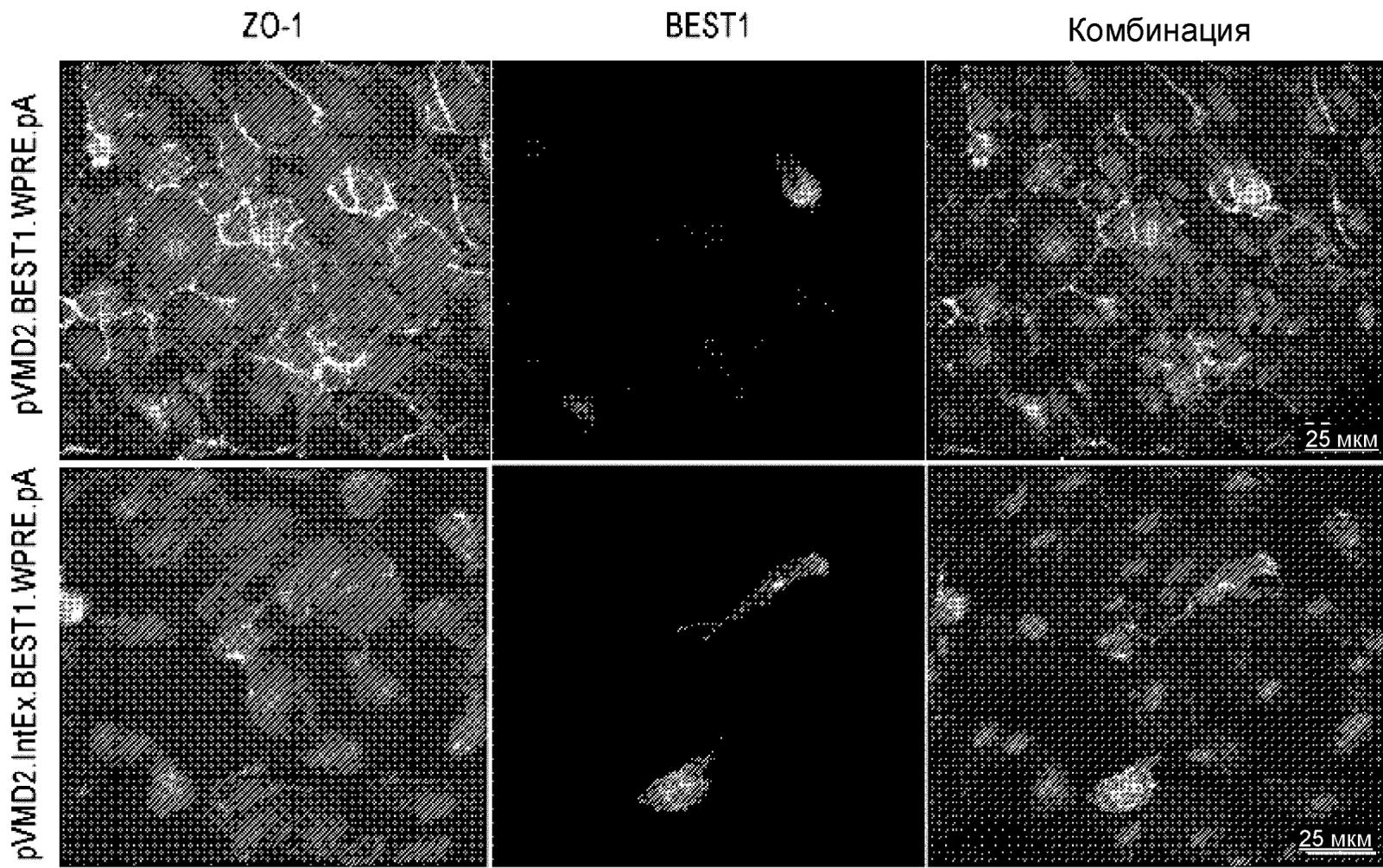
10 суток при 37°С со сменой среды каждые 4 дня

Анализ экспрессии BEST1 с помощью иммуногистохимии  
Двойное окрашивание, hBEST1 и ZO-1 (запирающая зона 1)

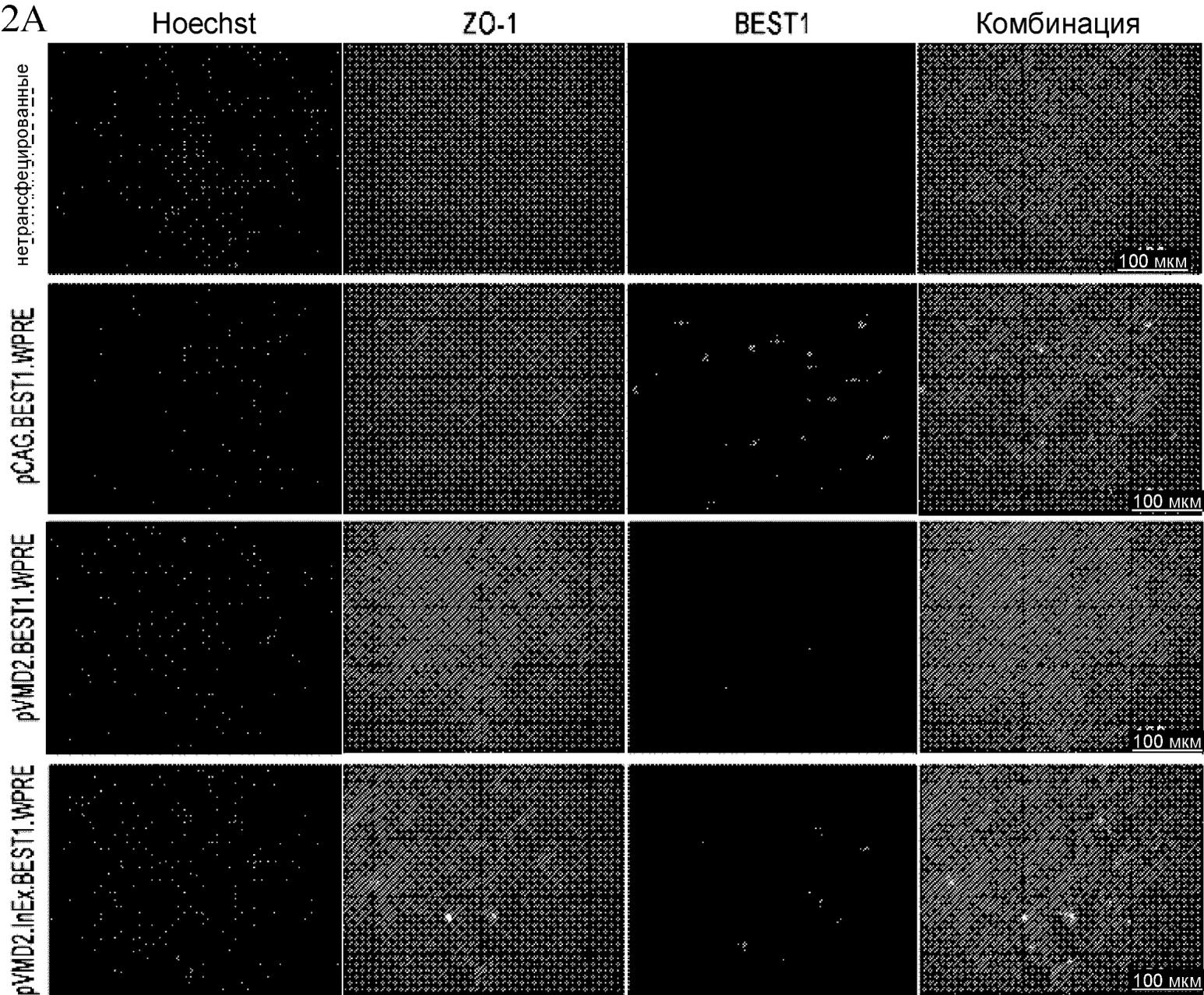
ФИГ. 11А



ФИГ. 11В



ФИГ. 12А

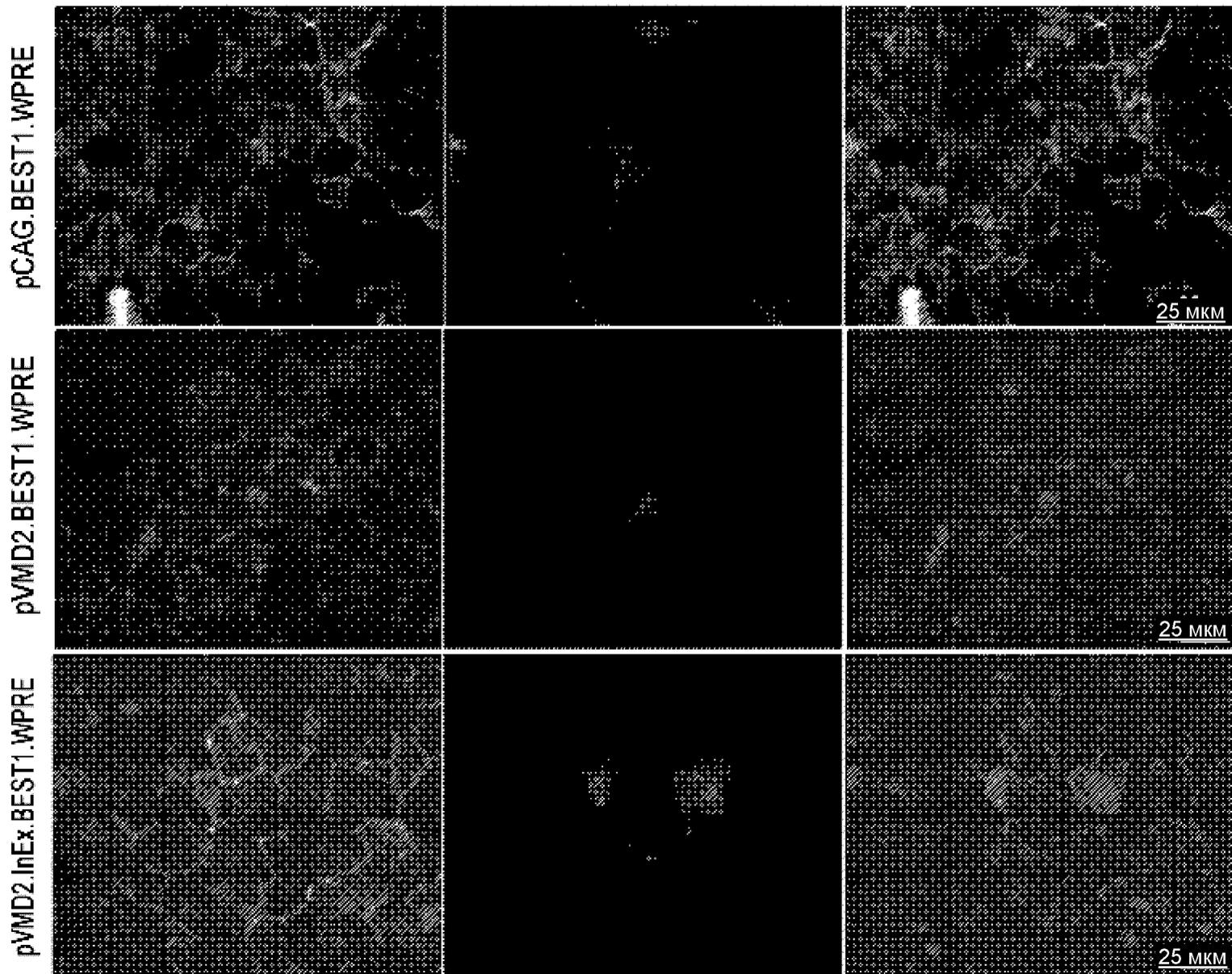


ФИГ. 12В

ZO-1

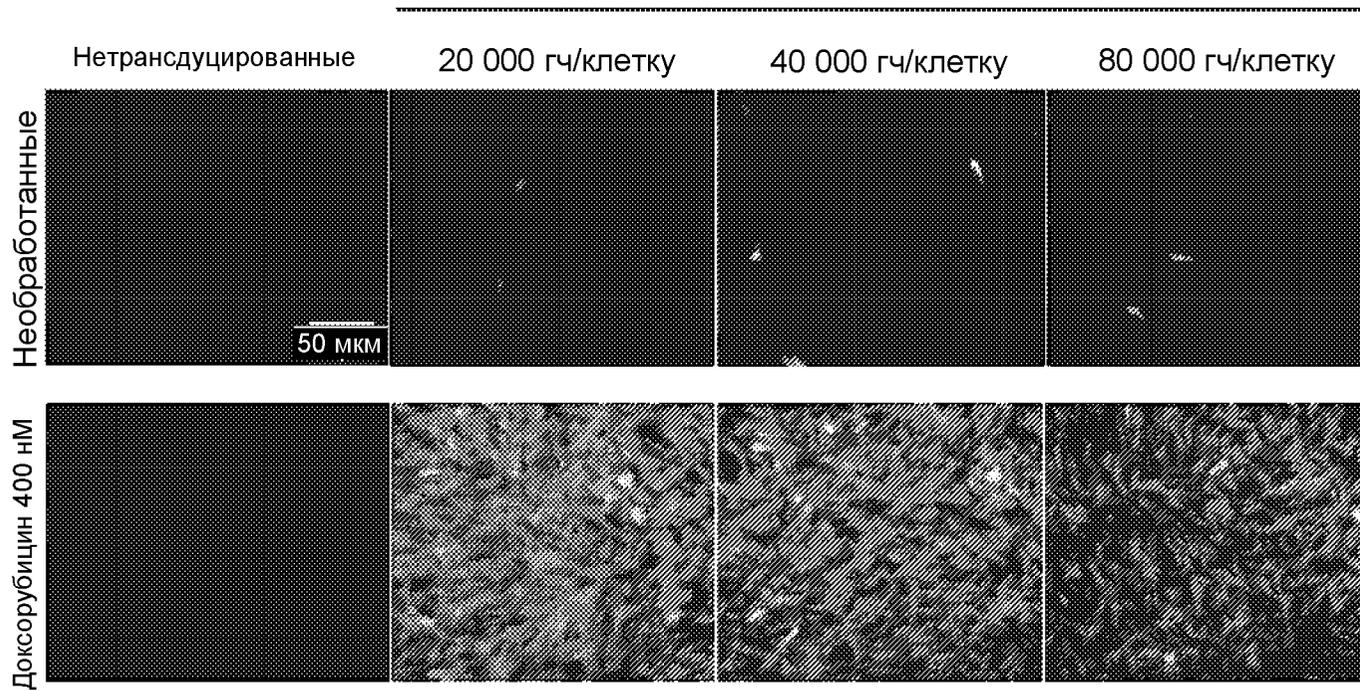
BEST1

Комбинация



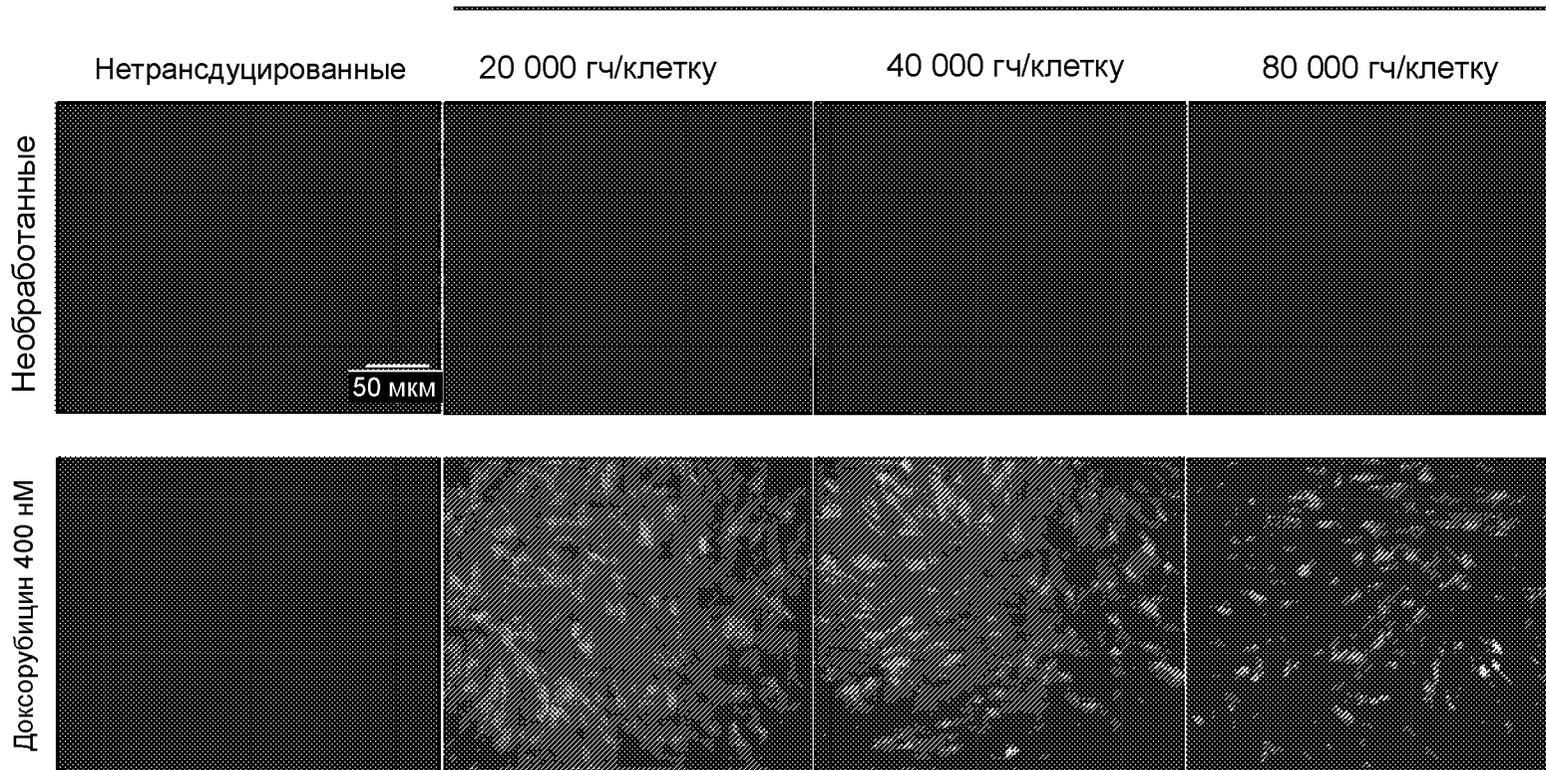
ФИГ. 13А

AAV2/2.CAG.GFP.WPRE

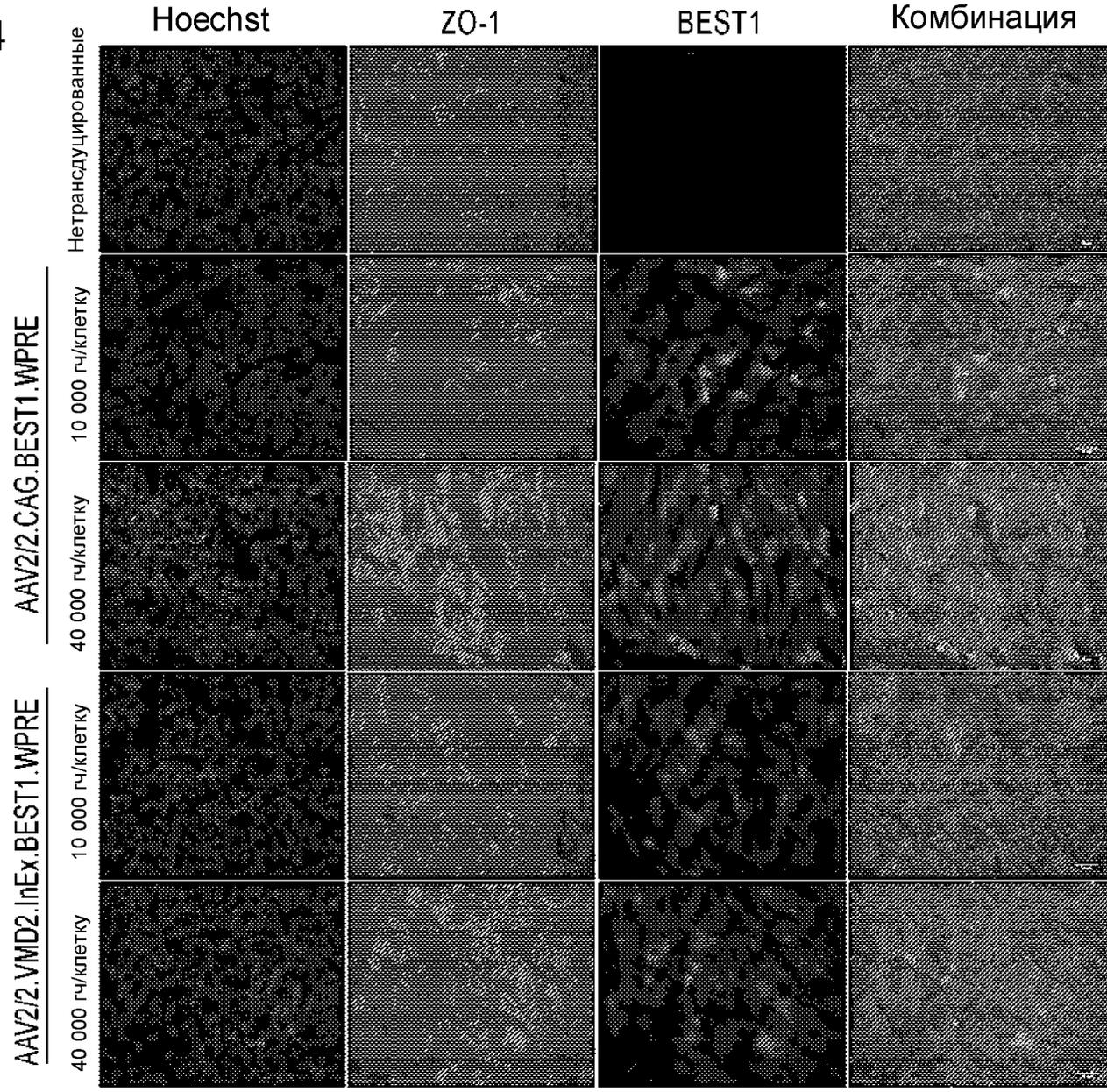


ФИГ. 13В

AAV2/2.VMD2.InEx.GFP.WPRE



ФИГ. 14



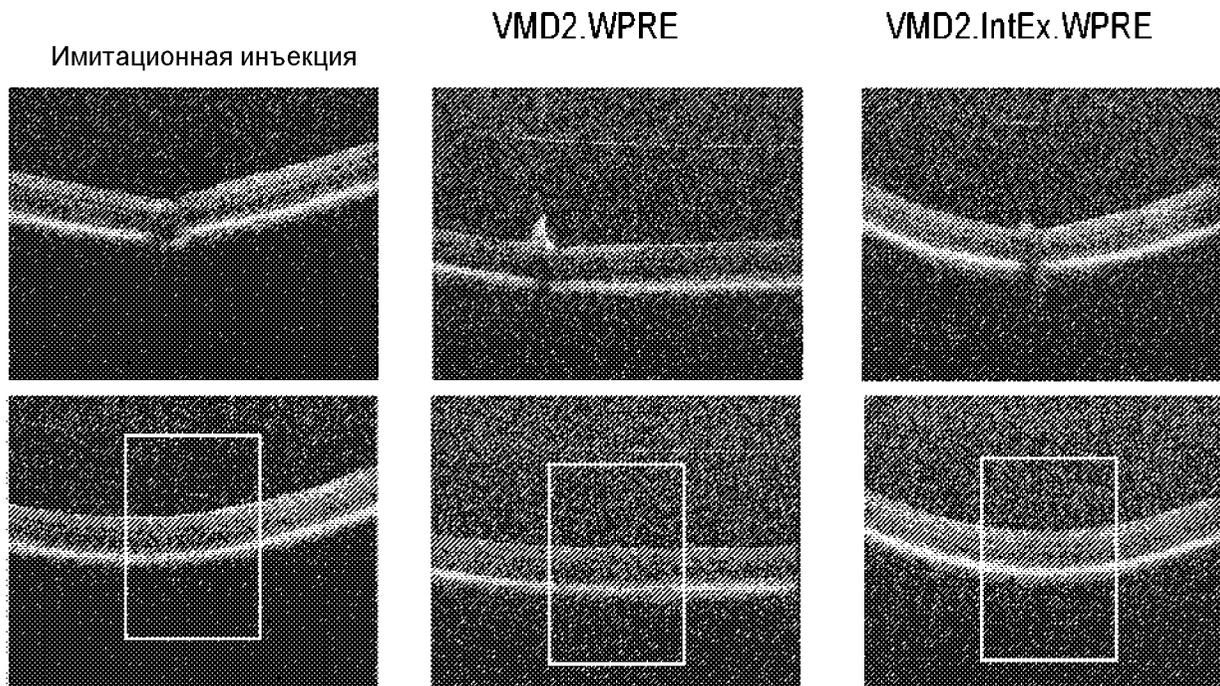
ФИГ. 15

4/8-недельное пилотное исследование in vivo:

Животное	Группа	№ животного	Неделя 4		Неделя 8	
			ОКТ	Умерщвленные	ОКТ	Умерщвленные
C57BL/6 мыши (всего 24)	Имитационная инъекция	6	6	3 мыши (1 глаз-ИГХ; 1 глаз -ВБ)	3	3 мыши (1 глаз-ИГХ; 1 глаз -ВБ)
	VMD2.BEST1.WPRE 1 x 10 <sup>9</sup> GC/мкл/глаз	6	6	3 мыши (3 глаза-ИГХ; 3 глаза -ВБ)	3	3 мыши (3 глаза-ИГХ; 3 глаза -ВБ)
	VMD2.IntEx.BEST1.WPRE 1 x 10 <sup>9</sup> GC/мкл/глаз	6	6	3 мыши (3 глаза-ИГХ; 3 глаза -ВБ)	3	3 мыши (3 глаза-ИГХ; 3 глаза -ВБ)
Умерщвление						
Результаты локализации (иммуногистохимия), экспрессии (Вестерн-блоттинг) и ретинальной токсичности (ОКТ)						

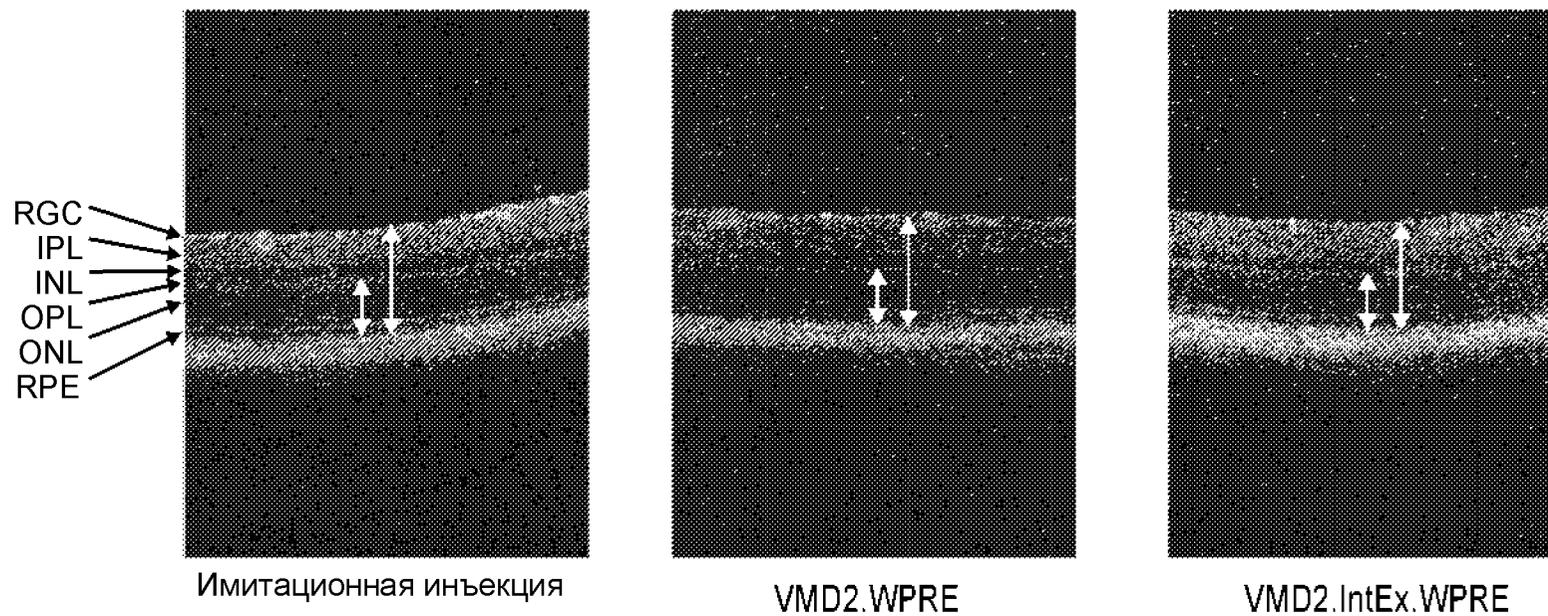
ФИГ. 16

4 недельное пилотное исследование *in vivo*: Оценка потенциальной токсичности



ФИГ. 17

4 недельное пилотное исследование *in vivo*: Оценка потенциальной токсичности

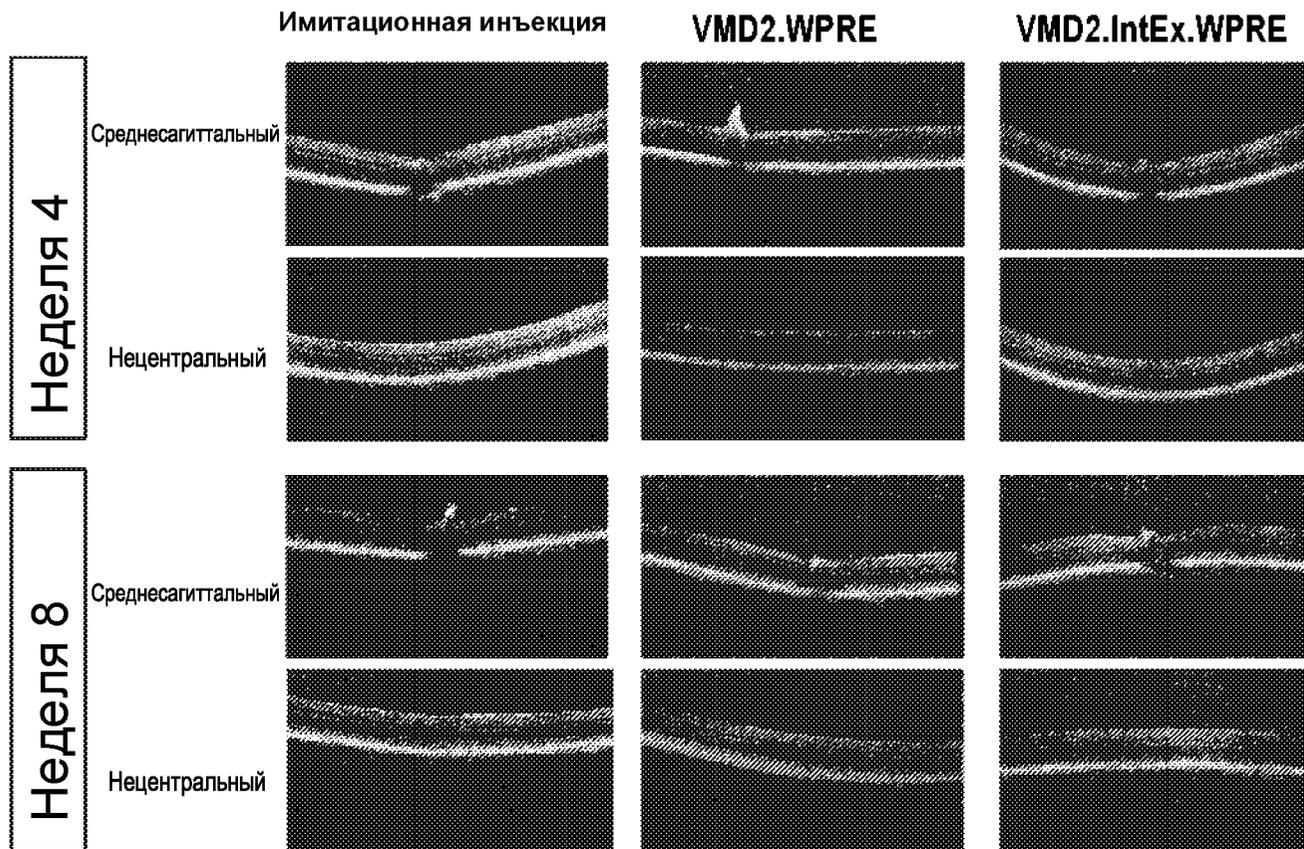


RGC- ганглиозные клетки сетчатки, IPL-внутренний плексиформный слой, INL-внутренний ядерный слой, OPL-внешний плексиформный слой, ONL-внешний ядерный слой, RPE-пигментный эпителий сетчатки

- обе конструкции VMD2 не проявляли какой-либо фоторецепторной токсичности по сравнению с имитационным лечением

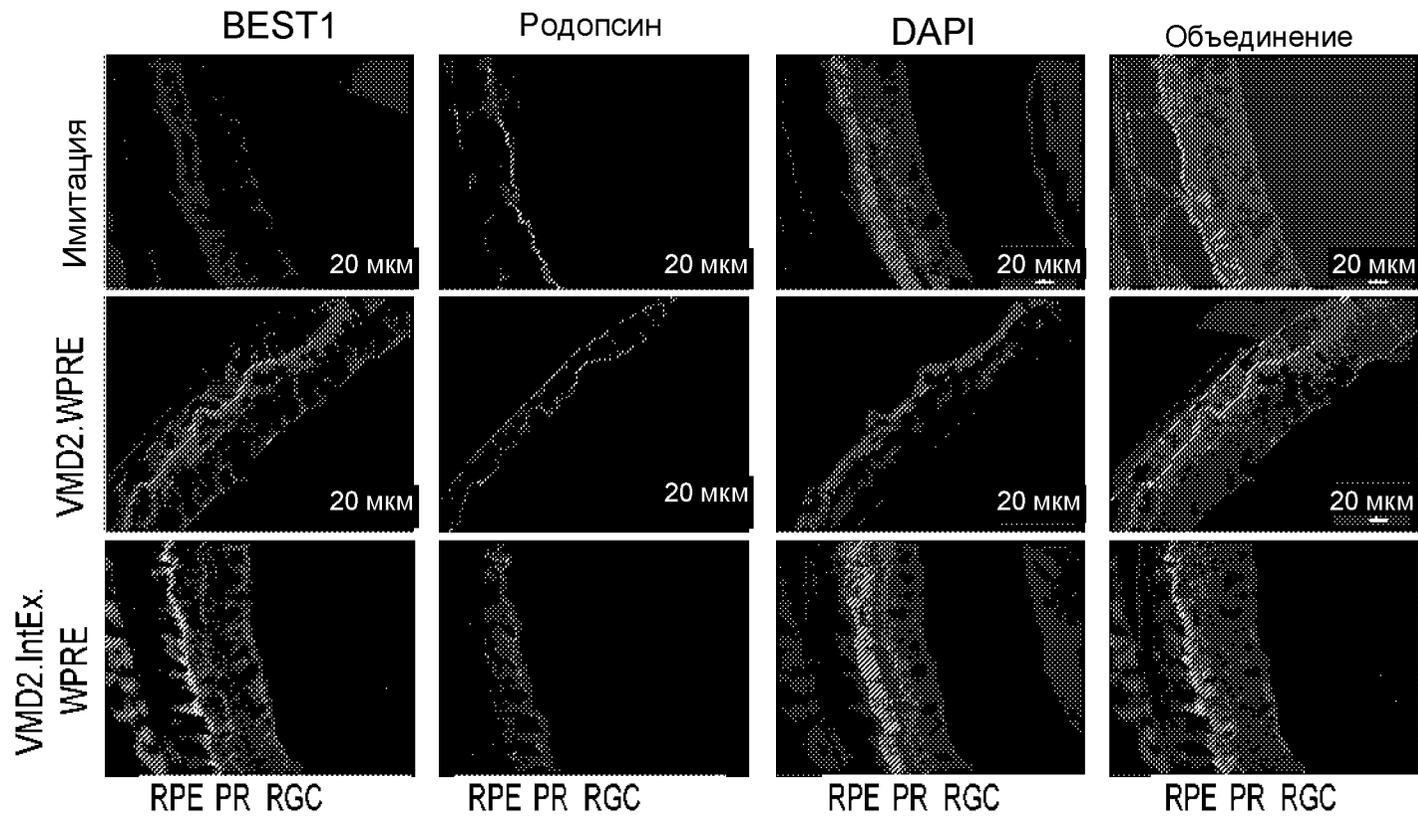
ФИГ. 18

4/8-недельное пилотное исследование *in vivo*: Оценка потенциальной токсичности



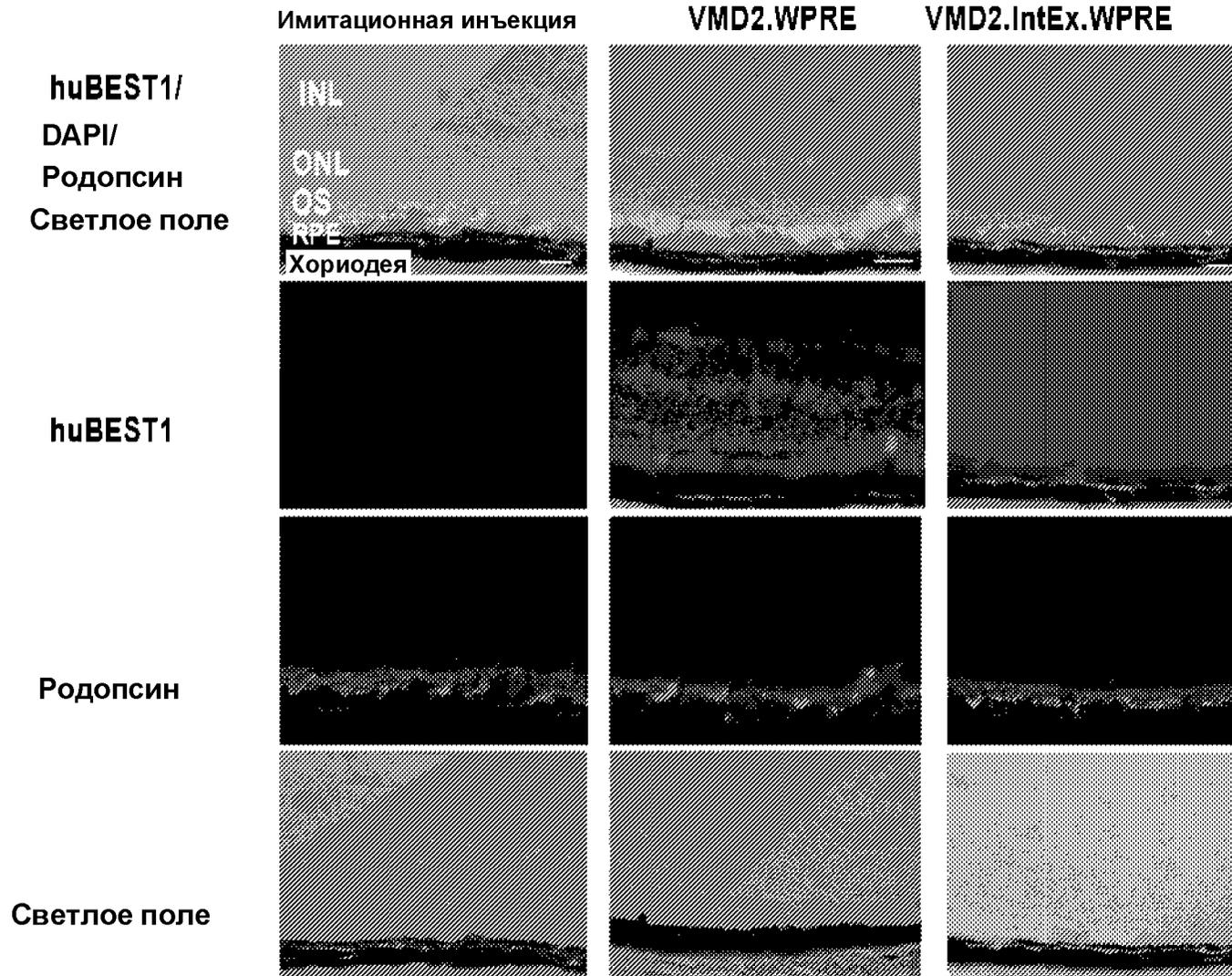
# ФИГ. 19

4/8-недельное пилотное исследование in vivo: Экспрессия и локализация на 4-й неделе



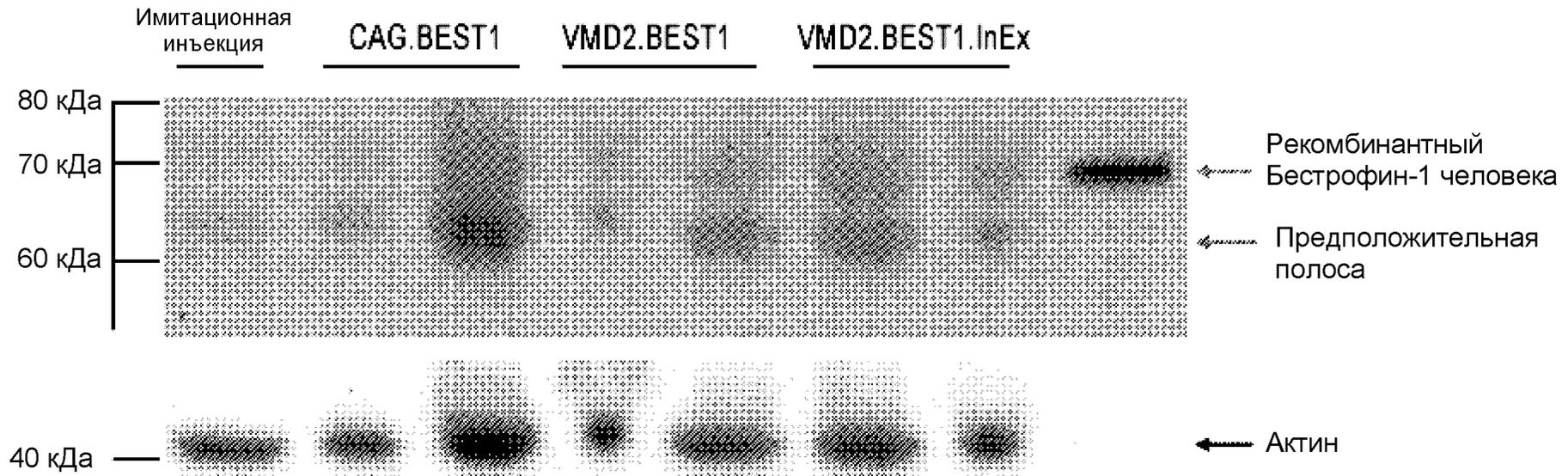
ФИГ. 20

4/8-недельное пилотное исследование in vivo: Экспрессия и локализация на 8-й неделе



ФИГ. 21

4/8-недельное пилотное исследование in vivo: Идентификация BEST1 с помощью вестерн-блоттинга (4 недели)



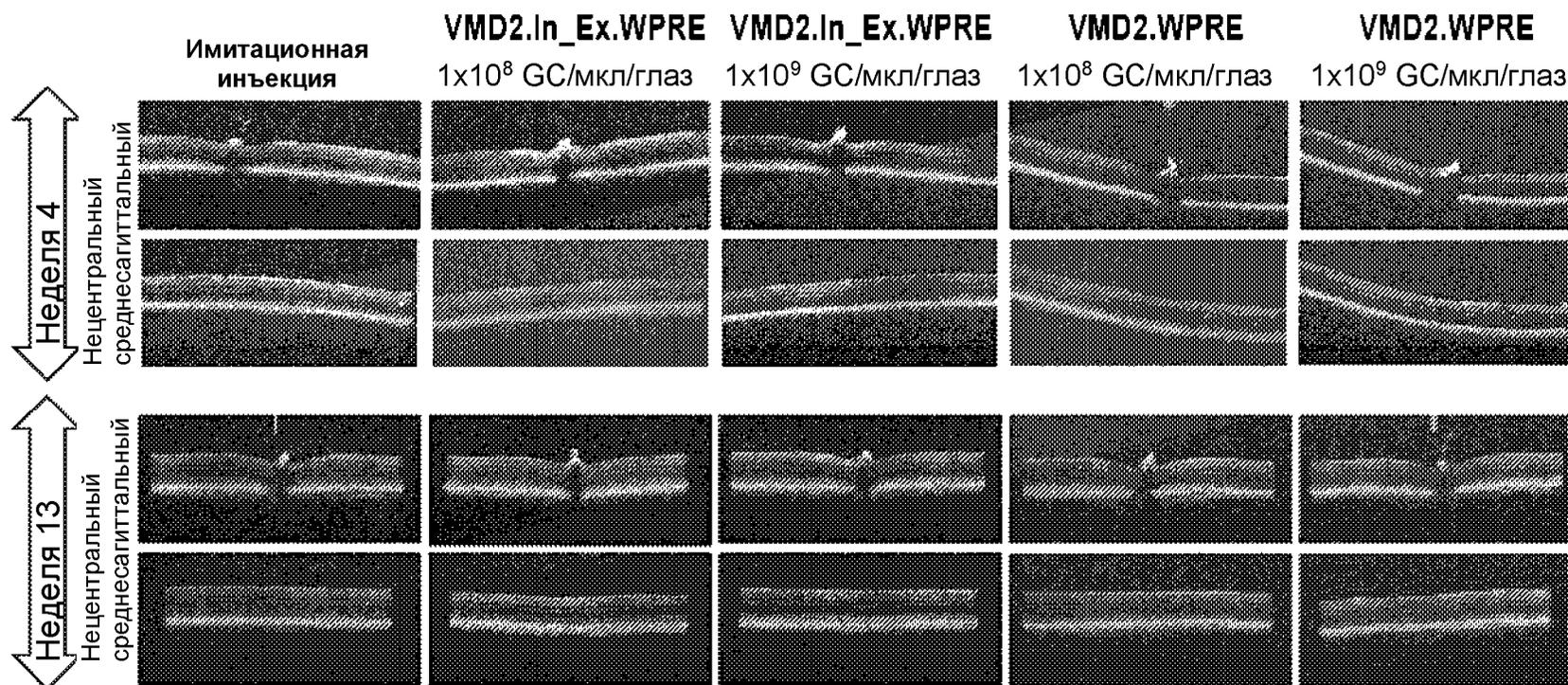
## ФИГ. 22

4/13-недельное исследование для подтверждения концепции *in vivo*: Протокол

Животное	Группа	№ животного	Неделя 4		Неделя 13	
			ОКТ	Умерщвление	ОКТ	Умерщвление
C57BL/6 мыши (всего 60 мышей; билатеральная инъекция)	Имитационная инъекция	12	12 мышей/ 24 глаза	4 мыши/ (1-ИГХ; 1-ВБ)	8 мышей/ 16 глаза	8 мыши/ (1-ИГХ; 1-ВБ)
	VMD2.IntEx.WPRE 1 x 10 <sup>8</sup> GC/мкл/глаз	12	12 мышей/ 24 глаза	4 мыши/ (4-ИГХ; 4-ВБ)	8 мышей/ 16 глаза	8 мыши/ (16-ИГХ; 16-ВБ)
	VMD2.In_Ex.WPRE 1 x 10 <sup>9</sup> GC/мкл/глаз	12	12 мышей/ 24 глаза	4 мыши/ (4-ИГХ; 4-ВБ)	8 мышей/ 16 глаза	8 мышей (16-ИГХ; 16-ВБ)
	VMD2.WPRE 1 x 10 <sup>8</sup> GC/мкл/глаз	12	12 мышей/ 24 глаза	4 мыши/ (4-ИГХ; 4-ВБ)	8 мышей/ 16 глаза	8 мышей (16-ИГХ; 16-ВБ)
	VMD2.WPRE 1 x 10 <sup>9</sup> GC/мкл/глаз	12	12 мышей/ 24 глаза	4 мыши/ (4-ИГХ; 4-ВБ)	8 мышей/ 16 глаза	8 мышей (16-ИГХ; 16-ВБ)
Умерщвление						
Результаты (ИГХ = иммуногистохимия, ВБ = вестерн-блоттинг)						

ФИГ. 23

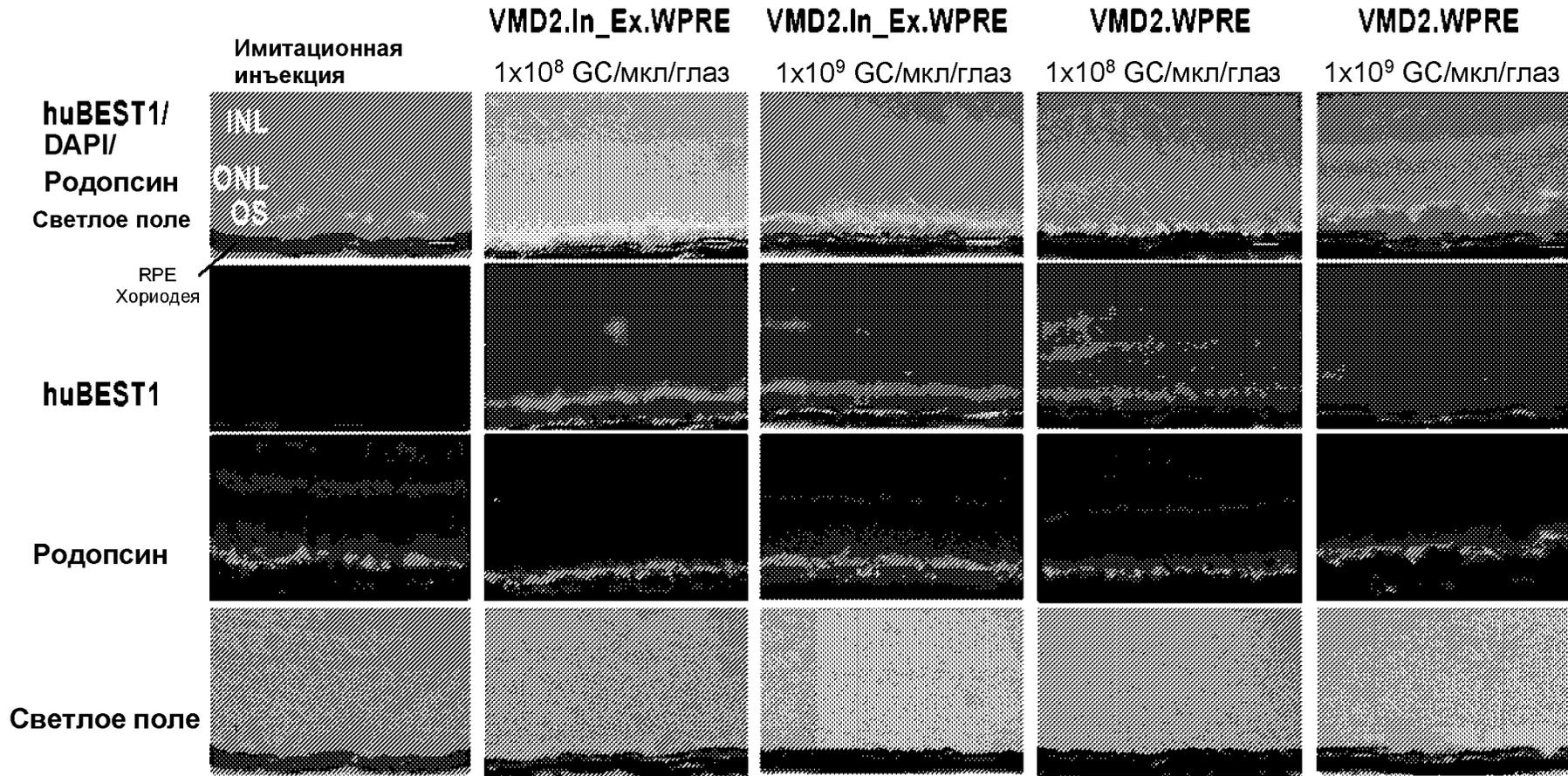
4/13-недельное исследование для подтверждения концепции *in vivo*: Оценка потенциальной токсичности на 4/13 неделях



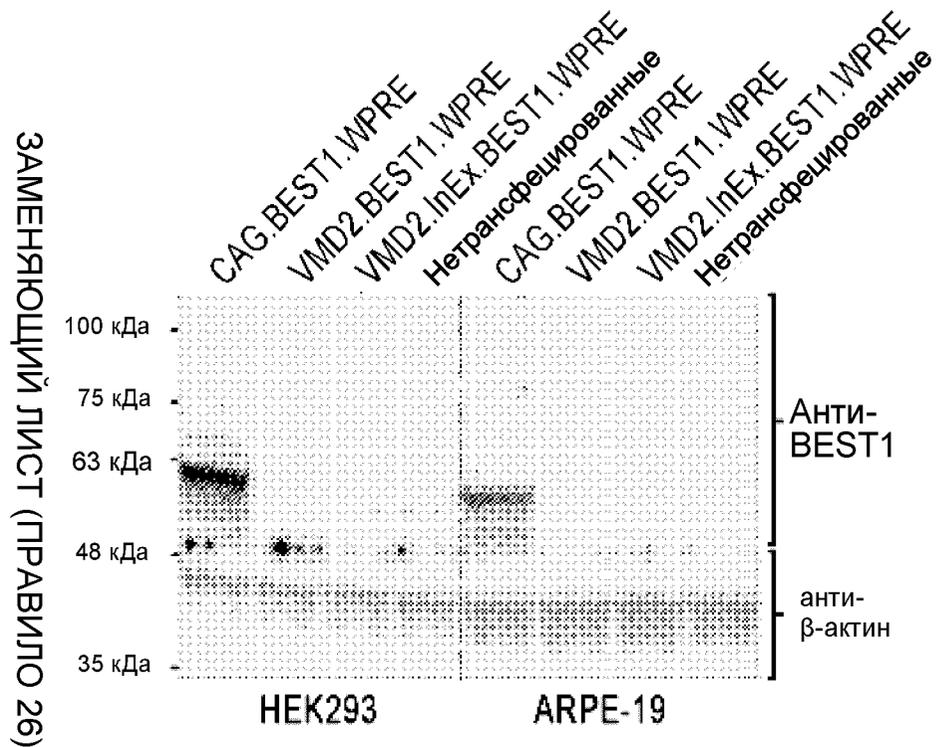
# ФИГ. 24

4/13-недельное исследование для подтверждения концепции *in vivo*: Экспрессия и локализация по иммуногистохимии на 4-й неделе

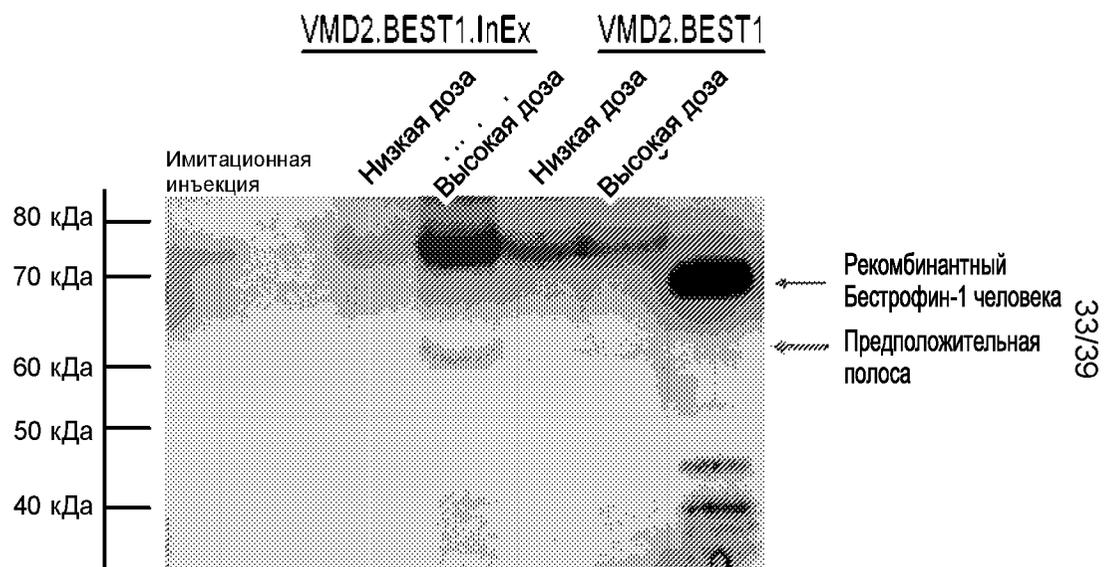
ЗАМЕНЯЮЩИЙ ЛИСТ (ПРАВИЛО 26)



ФИГ. 25А



ФИГ. 25В



Образец: RPE/Хориодея Комплекс

ФИГ. 26

4-недельное исследование *in vivo* для оценки экспрессии по вестерн-блоттингу: Протокол

Животное	Группа	№ животного	Неделя 4	
			ИГХ	ВБ
C57BL/6 мыши (Всего 20)	VMD2.InJx.WPRE 1 x 10 <sup>9</sup> GC/мкл/глаз	10 мышей/20 глаз	4 глаза	16 глаза
Умерщвление				
Результаты экспрессии (вестерн-блоттинг, ВБ) (4 глаза для каждой группы сохраняли для иммуногистохимии, ИГХ)				

## ФИГ. 27

Предлагаемое исследование согласно надлежащей лабораторной практике на мышах:  
 -Исследование по оценке потенциальной токсичности и биораспределения в основных органах

Группа	Основное исследование (4 недели)		Исследование на чувствительность (26 недель)	
	Самцы	Самки	Самцы	Самки
Контроль несущей средой	8	8	8	8
Низкая доза	8	8	8	8
Средняя доза	8	8	8	8
Высокая доза	8	8	8	8
Общее число животных	64		64	
Введение	Субретинальная инъекция, билатеральная, один раз в 1 день			
Основные Оценки	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Офтальмологическое исследование</li> <li>* тонометрия для IOP</li> <li>* ОКТ для оценки толщины сетчатки в группах восстановления (преддозирование, и в конце 4 и 13 недель)</li> <li>* Вскрытие и взвешивание органов</li> <li>* забор тканей для кПЦР: левый глаз, мозг, сердце, скелетные мышцы, легкое, печень, почка, яички, яичник</li> <li>* гистопатологическая оценка               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Стандартные ткани от животных для групп контрольной и высокой дозы; правый глаз и обширные поражения</li> </ul> </li> <li>От животных для групп низкой и средней дозы               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Полная окулярная гистопатологическая оценка: правый глаз от всех животных: и разрезы/срезы сохраняемые для возможной ИГХ</li> </ul> </li> <li>* сохранение тканей               <ul style="list-style-type: none"> <li>- ткани от животных для групп низкой и средней дозы хранили в формалине</li> </ul> </li> <li>*кПЦР (необязательно) В тканях с патологическими изменениями</li> </ul>			

## ФИГ. 28

### 4-недельное исследование по оценке токсичности *in vivo* для общей оценки: Протокол

Животное	Группа	№ животного	Неделя 4	
			ОКТ	Умерщвление
C57BL/6 мыши (Всего 12)	Имитационная инъекция	4	4	4 мыши/8 глаз (4-ИГХ; 4-ВБ)
	VMD2.IntEx.WPRE 2x 10 <sup>9</sup> GC/мкл/глаз	4	4	4 мыши/8 глаз (4-ИГХ; 4-ВБ)
	VMD2.IntEx.WPRE 5x10 <sup>9</sup> GC/мкл/глаз	4	4	4 мыши/8 глаз (4-ИГХ; 4-ВБ)
Умерщвление				
Результаты локализации (иммуногистохимия, ИГХ), экспрессии (Вестерн-блоттинг, ВБ) и ретинальной токсичности (ОКТ)				

## ФИГ. 29

Предлагаемое исследование согласно надлежащей лабораторной практике для оценки потенциальной токсичности для приматов, отличных от человека.

Группа	Основное исследование (26 недели)
Контроль несущей средой	3 самца (подростки, ' -24 месяца)
Высокая доза	3 самца (подростки, ~ 24 месяца)
Введение	Субретинальная инъекция, билатеральная, один раз в 1 день
Основные оценки	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Офтальмологическое исследование</li> <li>• Тонометрия для IOP</li> <li>• ОКТ для оценки толщины сетчатки в группах восстановления (преддозирование, и в конце 4, 8, 13 и 26 недель)</li> <li>• Вскрытие и взвешивание органов</li> <li>• Забор тканей для кПЦР: стекловидное тело, внутриглазная жидкость, образец сетчатки с хориоидеей в месте дозирования/нахождения пузыря и в месте вне данной области и оптический нерв из левого глаза; кровь (плазма), сердце, мозг, печень, почка, слюна, слезное выделение и селезенка.</li> <li>• Гистопатологическая оценка:             <ul style="list-style-type: none"> <li>- Стандартные ткани у больных животных</li> <li>- Полная окулярная гистопатологическая оценка: правый глаз от всех животных: и</li> </ul> </li> </ul> <p>разрезы/срезы сохраняемые для возможной ИГХ</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• кПЦР: собранных образцов тканей перечисленных выше (плюс данные о биораспределении AAB2)</li> </ul>

ФИГ. 30

Дозы при 2Е12 НПП концентрациях для исследования по оценке токсичности

	Низкая доза (гч)	Средняя доза (гч)	Высокая доза (гч)
Токс. доза для мыши (на глаз, на 1 мкл)	$2 \times 10^8$	$2 \times 10^9$	$5 \times 10^9$
Токс. НED (VV)*	$2 \times 10^{11}$	$2 \times 10^{12}$	$5 \times 10^{12}$
Предлагаемая доза для человека (на 100 мкл)	$2 \times 10^{10}$	$6 \times 10^{10}$	$2 \times 10^{11}$
Граница безопасности для человека (по сравнению с высокой клинической дозой)	X 1	X 10	X 25

\*НED - эквивалентная доза для человека на основе витреального объема (ВО) (1000:1 разница ВО)

## ФИГ. 31

### Дозы и концентрации

	Доза 1 (гч)	Доза 2 (гч)	Доза 3 (гч)	Доза 4 (гч)**
доза для мыши (на глаз, на 1 мкл)	$5 \times 10^8$	$1,5 \times 10^9$	$5 \times 10^9$	$5 \times 10^9$
NHP (примат, отличный от человека) эквив. доза (на 100 мкл)	$1,2 \times 10^{11}$	$4,5 \times 10^{11}$	$1,2 \times 10^{12}$	$1,2 \times 10^{12}$
НED* (ВО)	$5 \times 10^{11}$	$1,5 \times 10^{12}$	$5 \times 10^{12}$	$5 \times 10^{12}$
Предлагаемая доза для человека (на 100 мкл)	$5 \times 10^{10}$	$1,5 \times 10^{11}$	$5 \times 10^{11}$	$1,5 \times 10^{12}$
Граница безопасности для человека (по сравнению с высокой клинической дозой) мышь/NHP (примат, отличный от человека)	X100/X24	X30/X7,2	X10/X2,4	X3,3/X0,8
Необходимая концентрация серии			$5 \times 10^{12}$ DRP/мл	$1,5 \times 10^{13}$ DRP/мл

- Включите по меньшей мере  $5 \times 10^{12}$  концентрацию серии для достижения оптимальной эффективности в Группе 3 (5E11 доза)
- Если максимальная переносимая доза не достигнута в Группе 3 (5E11 доза), возможно увеличение дозы до  $1,5 \times 10^{12}$  в Группе 4; тем не менее, доза  $1,5 \times 10^{12}$  коррелирует с  $1,5 \times 10^{13}$  концентрацией серии и может приводить к токсичности, основываясь на полученных предварительных данных.

#### \*НED

- эквивалентная доза для человека на основе витреального объема (мышь) (1000:1 разница ВО)
- эквивалентная доза для человека на основе витреального объема (NHP, примат, отличный от человека) (2,4:1 разница ВО)