(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

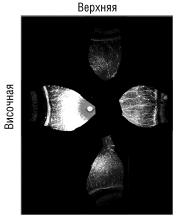
- Дата публикации заявки (43)2022.02.04
- Дата подачи заявки (22) 2020.04.24

(51) Int. Cl. A61K 48/00 (2006.01) **C07K 14/005** (2006.01) *C12N 15/86* (2006.01)

ВАРИАНТЫ КАПСИДОВ ААУ ДЛЯ ДОСТАВКИ В СТЕКЛОВИДНОЕ ТЕЛО (54)

- (31) 62/839,548; 62/923,924
- (32)2019.04.26; 2019.10.21
- US (33)
- (86) PCT/US2020/029895
- (87)WO 2020/219933 2020.10.29
- (71) Заявитель: АДВЕРУМ БАЙОТЕКНОЛОДЖИЗ, ИНК. (US)
- (72)Изобретатель: Керавала Анахита, Сепеда Диана, Гасми Мехди (US)
- (74)Представитель: Медведев В.Н. (RU)

Изобретение относится к вариантам капсидных белков аденоассоциированного вируса (AAV) (57) и к рекомбинантным вирионам AAV, имеющим один или более вариантов капсидных белков AAV. Настоящее изобретение относится также к композициям и способам для применения рекомбинантных вирионов AAV, например, для лечения или профилактики заболевания или нарушения.



Нижняя

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-570441EA/55

ВАРИАНТЫ КАПСИДОВ ААУ ДЛЯ ДОСТАВКИ В СТЕКЛОВИДНОЕ ТЕЛО

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] По этой заявке испрашивается приоритет временной заявки на патент США 62/839548, поданной 26 апреля 2019 г., и временной заявки на патент США 62/923924, поданной 21 октября 2019 г., полное содержание каждой из которых приведено в настоящем описании в качестве ссылки.

ПОДАЧА СПИСКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ В ТЕКСТОВОМ ФАЙЛЕ ASCII

[0002] Полное содержание следующего поданного текстового файла ASCII приведено в настоящем описании в качестве ссылки в полном объеме: машиночитаемая форма (CRF) списка последовательностей (наименование файла: 627002001140SEQLIST.TXT, дата записи: 21 апреля 2020 г., размер: 49 KB).

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0003] Многообещающим способом лечения и профилактики генетических и других заболеваний и нарушений является доставка продуктов терапевтических генов с использованием генотерапевтического вектора, такого как вирион. Иллюстративные примеры вирионов, пригодных для генотерапии, включают, но без ограничения, ретровирусные вирионы, лентивирусные вирионы, аденовирусные вирионы, вирионы вируса герпеса, альфавирусные вирионы и аденоассоциированные вирусные (AAV) вирионы. ААV представляет собой составляющий 4,7 т.п.о., одноцепочечный ДНК-вирус. Рекомбинантные вирионы, основанные на AAV (вирионы гААV) ассоциированы с отличной клинической безопасностью, поскольку AAV дикого типа является непатогенным и не имеет этиологической ассоциации с какими-либо известными заболеваниями. Кроме того, AAV предлагает возможность высоко эффективной доставки гена и длительной экспрессии трансгена в многочисленных тканях, включая ткани глаза, мышцы, легкого и головного мозга.

[0004] Конкретные проблемы, которые остаются применительно к дизайну вирионов для использования в генотерапии, включают оптимизацию вирусного тропизма для клетки и, в частности, применительно к генотерапии глаза, оптимизацию доставки в сетчатку. Таким образом, существует необходимость в оптимизированных вирионах для экспрессии генов в выбранных клетках млекопитающих. Настоящее изобретение направлено на эту необходимость посредством предоставления модифицированных капсидных белков AAV, обеспечивающих преимущество для доставки рекомбинантных вирионов AAV в желательные клетки и ткани.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0005] Настоящее изобретение относится к вирионам рекомбинантного аденоассоциированного вируса (AAV), содержащим: (а) вариант капсидного белка AAV, содержащий модифицированную последовательность, содержащую одну или более аминокислотных замен в пределах аминокислотных остатков 570-579, относительно

исходного капсидного белка AAV, где модифицированная последовательность содержит HKFKSGD (SEQ ID NO: 1), и где нумерация аминокислотных остатков соответствует капсидному белку VP1 AAV5; и (b) полинуклеотидную последовательность, кодирующую продукт терапевтического гена.

[0006] В некоторых вариантах осуществления, исходный капсидный белок AAV представляет собой капсидный белок AAV5 или гибридный капсидный белок AAV5 и AAV2. В некоторых вариантах осуществления, исходный капсидный белок AAV представляет собой капсидный белок AAV2.5T. В некоторых вариантах осуществления, исходный капсидный белок AAV представляет собой капсидный белок VP1 AAV2.5T.

[0007] В некоторых вариантах осуществления, модифицированная последовательность содержит LAHKFKSGDA (SEQ ID NO: 3). В некоторых вариантах осуществления, вариант капсидного белка AAV содержит капсидную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% гомологию с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO:5. В некоторых вариантах осуществления, вариант капсидного белка AAV содержит капсидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 7.

[0008] В некоторых вариантах осуществления, вирион rAAV представляет собой вариант AAV5 или вариант гибридного вириона AAV2 и AAV5. В некоторых вариантах осуществления, вирион rAAV представляет собой вариант вириона AAV2.5T.

[0009] В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантный вирион AAV является способным к трансдукции клеток сетчатки при инъекции в стекловидное тело млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантный вирион AAV является способным к трансдукции одного или более из: фоторецептора, ганглионарной сетчатки, клетки Мюллера, биполярной клетки, клетки амакриновой горизонтальной клетки и клетки пигментного эпителия сетчатки при инъекции в стекловидное тело млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантный вирион AAV является способным к трансдукции клеток пигментного эпителия сетчатки при инъекции в стекловидное тело млекопитающего.

[0010] В некоторых вариантах осуществления, продукт терапевтического гена представляет собой миРНК, мкРНК или белок. В некоторых вариантах осуществления, продукт терапевтического гена представляет собой продукт гена против фактора роста эндотелия сосудов (против VEGF). В некоторых вариантах осуществления, продукт терапевтического гена представляет собой опсин.

[0011] В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид, кодирующий продукт терапевтического гена, фланкирован одним или более ITR AAV. В некоторых вариантах осуществления, один или более ITR AAV представляют собой ITR AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, птичьего AAV, бычьего AAV, собачьего AAV, лошадиного AAV, AAV приматов, не относящегося к приматам AAV или овечьего AAV, или их варианты. В некоторых вариантах осуществления, один или более ITR AAV представляют собой ITR AAV2 или ITR AAV5.

[0012] В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантный вирион AAV имеет измененный клеточный тропизм по сравнению с AAV2.5T.

[0013] В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантный вирион AAV, описанный в настоящем описании, предназначен для использования в способе лечения заболевания или нарушения сетчатки у нуждающегося в этом субъекта, включающем введение фармацевтической композиции, содержащей рекомбинантный вирион AAV, субъекту посредством инъекции в стекловидное тело. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантный вирион AAV, описанный в настоящем описании, предназначен для использования в получении лекарственного средства для лечения заболевания или нарушения сетчатки субъекта. В некоторых вариантах осуществления, заболевание или нарушение представляет собой связанную с возрастом дегенерацию желтого пятна (AMD), влажную AMD, сухую AMD, неоваскуляризацию сетчатки, хориоидальную неоваскуляризацию, диабетическую ретинопатию, пролиферативную диабетическую ретинопатию, окклюзию вены сетчатки, окклюзию центральной вены сетчатки, окклюзию ветви вены сетчатки, диабетический отек желтого пятна, диабетическую ишемию сетчатки, ишемическую ретинопатию или диабетический отек сетчатки.

[0014] Настоящее изобретение относится также к фармацевтическим композициям, содержащим рекомбинантный вирион AAV, описанный в настоящем описании.

[0015] Настоящее изобретение относится также к способам получения вириона гААV, включающим: (а) культивирование клетки-хозяина в таких условиях, что продуцируются вирионы гААV, где клетка-хозяин содержит: (і) полинуклеотид, кодирующий вариант капсидного белка ААV, содержащий модифицированную последовательность, содержащую одну или более аминокислотных замен в пределах аминокислотных остатков 570-579, относительно исходного капсидного белка ААV, где модифицированная последовательность содержит HKFKSGD (SEQ ID NO: 1); (іі) полинуклеотид, кодирующий белок гер; (ііі) полинуклеотидную кассету, содержащую последовательность, кодирующую продукт терапевтического гена, фланкированный по меньшей мере одним ITR AAV; и (іv) функции помощника AAV; и (b) выделение вириона гААV, продуцированного клеткой-хозяином.

[0016] Настоящее изобретение относится также к способам предоставления продукта терапевтического гена в сетчатке субъекта, включающим введение субъекту посредством инъекции в стекловидное тело рекомбинантного вириона AAV, описанного в настоящем описании, или фармацевтической композиции, описанной в настоящем описании.

[0017] В некоторых вариантах осуществления, у субъекта диагностировано, или он, как подозревают, имеет одно или более состояний, выбранных из группы, состоящей из: острой нейроретинопатии желтого пятна, болезни Бехчета, хориоидальной неоваскуляризации, диабетического увеита, гистоплазмоза, дегенерации желтого пятна, отека, мультифокального хороидита, травмы глаза, затрагивающей задний сегмент или

участок глаза, опухоли глаза, окклюзии центральной вены сетчатки, диабетической ретинопатии, пролиферативной витреоретинопатии (PVR), окклюзионного поражения артерий сетчатки, отслоения сетчатки, увеального заболевания сетчатки, симпатической офтальмии, синдрома Фогта-Коянаги-Харада (VKH), увеальной диффузии, состояния, затрагивающего задний сегмент глаза, которое вызывает или на которое влияет лазерная терапия глаза, состояния, затрагивающего задний сегмент глаза, которые вызывает или на которые влияет фотодинамическая терапия, фотокоагуляции, радиационной ретинопатии, нарушения эпиретинальной мембраны, окклюзии ветви вены сетчатки, передней ишемической оптической невропатии, диабетической ишемии сетчатки, ишемической ретинопатии, неретинопатической диабетической дисфункции сетчатки, ретиношизиса, пигментного ретинита, глаукомы, синдрома Ашера, колбочко-палочковой дистрофии, болезни Штаргардта, наследственной дегенерации желтого пятна, хориоретинальной дегенерации, врожденного амавроза Лебера, врожденной стационарной ночной слепоты, хороидеремии, синдрома Барде-Бидля, телеангиэктозии желтого пятна, наследственной оптической невропатии Лебера, ретинопатии недоношенных и нарушения цветного зрения.

[0018] Настоящее изобретение относится также к способам лечения заболевания или нарушения сетчатки у нуждающегося в этом субъекта, включающим введение субъекту посредством инъекции в стекловидное тело рекомбинантного вириона AAV, описанного в настоящем описании, или фармацевтической композиции, описанной в настоящем описании.

[0019] В некоторых вариантах осуществления, заболевание или нарушение представляет собой острую нейроретинопатию желтого пятна, болезнь Бехчета, хориоидальную неоваскуляризацию, диабетический увеит, гистоплазмоз, дегенерацию желтого пятна, отек, мультифокальный хороидит, травму глаза, затрагивающую задний сегмент или участок глаза, опухоль глаза, окклюзию центральной вены сетчатки, пролиферативную диабетическую ретинопатию, витреоретинопатию (PVR), окклюзионное поражение артерий сетчатки, отслоение сетчатки, увеальное заболевание сетчатки, симпатическую офтальмию, синдром Фогта-Коянаги-Харада (VKH), увеальную диффузию, состояние, затрагивающее задний сегмент глаза, которое вызывает или на которое влияет лазерная терапия глаза, состояния, затрагивающие задний сегмент глаза, которые вызывает или на которые влияет фотодинамическая терапия, фотокоагуляцию, радиационную ретинопатию, нарушения эпиретинальной мембраны, окклюзию ветви вены сетчатки, переднюю ишемическую оптическую невропатию, диабетическую ишемию сетчатки, ишемическую ретинопатию, неретинопатическую диабетическую дисфункцию сетчатки, ретиношизис, пигментный ретинит, глаукому, синдром Ашера, колбочко-палочковую дистрофию, болезнь Штаргардта, наследственную дегенерацию желтого пятна, хориоретинальную дегенерацию, врожденный амавроз врожденную стационарную ночную слепоту, хороидеремию, синдром Барде-Бидля,

телеангиэктозию желтого пятна, наследственную оптическую невропатию Лебера, ретинопатию недоношенных или нарушение цветного зрения.

[0020] Настоящее изобретение относится также к вариантам капсидных белков AAV, содержащим модифицированную последовательность, содержащую одну или более аминокислотных замен в пределах аминокислотных остатков 570-579, относительно исходного капсидного белка AAV, где модифицированная последовательность содержит HKFKSGD (SEQ ID NO: 1), и где нумерация аминокислотных остатков соответствует капсидному белку VP1 AAV5.

[0021] В некоторых вариантах осуществления, исходный капсидный белок AAV представляет собой капсидный белок AAV5 или гибридный капсидный белок AAV5 и AAV2. В некоторых вариантах осуществления, исходный капсидный белок AAV представляет собой капсидный белок AAV представляет собой капсидный белок AAV представляет собой капсидный белок VP1 AAV2.5T.

[0022] В некоторых вариантах осуществления, модифицированный капсидный белок AAV содержит LAHKFKSGDA (SEQ ID NO: 3) в аминокислотных остатках 570-579, относительно исходного капсидного белка AAV. В некоторых вариантах осуществления, вариант капсидного белка AAV содержит капсидную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% гомологию с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO:5. В некоторых вариантах осуществления, вариант капсидного белка AAV содержит капсидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 7.

[0023] Настоящее изобретение относится также к нуклеиновым кислотам, содержащим последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие вариант капсидного белка AAV, описанный в настоящем описании.

[0024] Настоящее изобретение относится также к экспрессирующим векторам, содержащим нуклеиновую кислоту, описанную В настоящем описании, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая вариант капсидного белка ААУ, является функционально связанной с промоторной последовательностью. В некоторых экспрессирующий вариантах осуществления, вектор дополнительно содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую белок гер.

[0025] Настоящее изобретение относится также к клеткам, содержащим экспрессирующий вектор, описанный в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления, клетка дополнительно содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую продукт терапевтического гена. В некоторых вариантах осуществления, продукт терапевтического гена представляет собой миРНК, мкРНК или белок. В некоторых вариантах осуществления, продукт терапевтического гена представляет собой продукт гена против фактора роста эндотелия сосудов (против VEGF). В некоторых вариантах осуществления, лекарственное средство представляет собой опсин.

[0026] В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид, кодирующий продукт терапевтического гена, фланкирован одним или более ITR AAV. В некоторых

вариантах осуществления, один или более ITR AAV представляют собой ITR AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, птичьего AAV, бычьего AAV, собачьего AAV, лошадиного AAV, AAV приматов, не относящегося к приматам AAV или овечьего AAV, или их варианты. В некоторых вариантах осуществления, один или более ITR AAV представляют собой ITR AAV2 или ITR AAV5.

[0027] Полное содержание всех ссылок, процитированных в настоящем описании, включая патентные заявки и публикации, приведено в качестве ссылки.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[0028] На ФИГ. 1А показано схематическое представление сетчатки и локализаций концентрических вырубок образца. Вырубка 1 содержит желтое пятно (малая концентрическая вырубка); вырубка 2 содержит парафовею; оставшаяся ткань содержит периферическую сетчатку, включая аркады кровеносных сосудов.

[0029] На ФИГ. 1В-1Е показана относительная распространенность вариантов капсидов на различных стадиях процесса отбора. На ФИГ. 1В показан процент наилучших 100 вариантов в исходной библиотеке; На ФИГ. 1С показан процент наилучших 100 вариантов, идентифицированных в парафовее, желтом пятне или периферических областях сетчатки, из второго цикла скрининга. На ФИГ. 1D показан процент наилучших 50 эволюционирующих вариантов, успешно трансдуцировавших клетки парафовеи и RPE, из библиотек цикла 2, происходящих из парафовеи. На ФИГ. 1E процент наилучших 50 эволюционирующих вариантов, успешно показан трансдуцировавших клетки желтого пятна+периферии, ИЗ библиотек цикла 2, происходящих из парафовеи.

[0030] На ФИГ. 2 показаны результаты дот-блоттинга фракций с колонки с гепарином для AAV2.5T и варианта капсида AAV2.5T.LSV1. Элюаты E1 - E10 имеют увеличивающиеся концентрации NaCl 0,1M (E1), 0,2M (E2), 0,3M (E3), 0,4M (E4), 0,5M (E5), 0,6M (E6), 0,7M (E7), 0,8M (E8), 0,9M (E9) и 1,0M (E10).

[0031] На ФИГ. 3 показаны изображения в реальном времени экспрессии GFP в 6 мм эксплантатах сетчатки свиньи на сутки 7 или сутки 14 после инфекции с использованием 2 E+10 гв (т.е., 2E10 гв) или 4 E+10 гв (т.е., 4E10 гв) вирионов AAV2.5T.LSV1, кодирующих GFP.

[0032] На ФИГ. 4А-4С представлены изображения ОТС аутофлуоресценции сетчатки африканской зеленой мартышки на сутки 14 (ФИГ. 4А), сутки 21 (ФИГ. 4В) и сутки 28 (ФИГ. 4С) после введения в стекловидное тело вирионов AAV2.5T.LSV1, кодирующих GFP, показывающие экспрессию GFP в фовее и аркадах кровеносных сосудов.

[0033] На ФИГ. 4D-4E представлены полученные с использованием устройства Heidelberg Spectralis изображения левой (ФИГ. 4D) и правой (ФИГ. 4E) сетчатки африканской зеленой мартышки на сутки 28 после введения в стекловидное тело вирионов AAV2.5T.LSV1, кодирующих GFP, показывающие экспрессию GFP в фовее и аркадах кровеносных сосудов.

[0034] На ФИГ. 5А-5В представлены изображения флуоресценции фиксированной сетчатки африканской зеленой мартышки после введения в стекловидное тело вирионов AAV2.5T.LSV1, кодирующих GFP.

[0035] На ФИГ. 5С-5D представлены изображения флуоресценции фиксированной сетчатки африканской зеленой мартышки после введения в стекловидное тело вирионов AAV2.5T.LSV1, кодирующих GFP, для левого глаза (ФИГ. 5С) и для правого глаза (ФИГ. 5D).

[0036] На ФИГ. 5Е представлены профили интенсивности GFP, нанесенные на график на протяжении расстояния от желтого пятна до ресничного тела, для глаз, показанных на ФИГ. 5С-5D. Локализации области сетчатки рассчитывали по средним расстояниям, относительно центра фовеи.

[0037] На ФИГ. 6А-6С представлены изображения флуоресценции от фовеи до ресничного тела глаза африканской зеленой мартышки после введения в стекловидное тело вирионов AAV2.5T.LSV1, кодирующих GFP. На ФИГ. 6А показана экспрессия GFP. На ФИГ. 6В показано окрашивание ядер посредством DAPI. ФИГ. 6С представляет собой составное изображение ФИГ. 6А и ФИГ. 6В.

[0038] На ФИГ. 7 представлено изображение флуоресценции GFP, экспрессированного в фовее глаза африканской зеленой мартышки после введения в стекловидное тело вирионов AAV2.5T.LSV1, кодирующих GFP.

[0039] На **ФИГ.** 8 представлено изображение флуоресценции GFP, экспрессированного в фовее глаза африканской зеленой мартышки после введения в стекловидное тело вирионов AAV2.5T.LSV1, кодирующих GFP.

[0040] На ФИГ. 9А-9D представлены изображения флуоресценции фовеи глаза африканской зеленой мартышки после введения в стекловидное тело вирионов AAV2.5T.LSV1, кодирующих GFP. На ФИГ. 9А показано составное изображение ФИГ. 9В-9D. На ФИГ. 9В показано окрашивание ядер посредством DAPI. На ФИГ. 9С показана экспрессия GFP. На ФИГ. 9D показано мечение посредством антитела против родопсина палочковых фоторецепторных клеток.

[0041] На ФИГ. 10А-10D представлены изображения флуоресценции фовеи глаза африканской зеленой мартышки после введения в стекловидное тело вирионов AAV2.5T.LSV1, кодирующих GFP. На ФИГ. 10А показано составное изображение ФИГ. 10В-10D. На ФИГ. 10В показано окрашивание ядер посредством DAPI. На ФИГ. 10С показана экспрессия GFP. На ФИГ. 10D показано мечение посредством антитела против глутаминсинтетазы клеток Мюллера.

[0042] На ФИГ. 11 представлено изображение флуоресценции GFP, экспрессированного в сетчатке глаза африканской зеленой мартышки после введения в стекловидное тело вирионов AAV2.5T.LSV1, кодирующих GFP.

[0043] На ФИГ. 12А-12С представлены изображения флуоресценции сетчатки глаза африканской зеленой мартышки после введения в стекловидное тело вирионов AAV2.5T.LSV1, кодирующих GFP. ФИГ. 12А представляет собой составное изображение

ФИГ. 12В и **ФИГ. 12С**. На **ФИГ. 12В** показано окрашивание ядер посредством DAPI. На **ФИГ. 12С** показана экспрессия GFP.

[0044] На ФИГ. 13А-13D представлены изображения флуоресценции сетчатки глаза африканской зеленой мартышки после введения в стекловидное тело вирионов AAV2.5T.LSV1, кодирующих GFP. На ФИГ. 13A показано составное изображение ФИГ. 13В-13D. На ФИГ. 13B показано окрашивание ядер посредством DAPI. На ФИГ. 13С показана экспрессия GFP. На ФИГ. 13D показано мечение посредством антитела против глутаминсинтетазы клеток Мюллера.

[0045] На ФИГ. 14А-14D представлены изображения флуоресценции сетчатки глаза африканской зеленой мартышки после введения в стекловидное тело вирионов AAV2.5T.LSV1, кодирующих GFP. На ФИГ. 14A показано составное изображение ФИГ. 14В-14D. На ФИГ. 14B показано окрашивание ядер посредством DAPI. На ФИГ. 14С показана экспрессия GFP. На ФИГ. 14D показано мечение посредством антитела против глутаминсинтетазы клеток Мюллера.

[0046] На ФИГ. 15А-15D представлены изображения флуоресценции сетчатки глаза африканской зеленой мартышки после введения в стекловидное тело вирионов AAV2.5T.LSV1, кодирующих GFP. На ФИГ. 15А показано составное изображение ФИГ. 15В-15D. На ФИГ. 15В показано окрашивание ядер посредством DAPI. На ФИГ. 15С показана экспрессия GFP. На ФИГ. 15D показано мечение посредством антитела против глутаминсинтетазы клеток Мюллера.

[0047] На ФИГ. 16А-16Е представлены изображения флуоресценции сетчатки глаза африканской зеленой мартышки после введения в стекловидное тело вирионов AAV2.5T.LSV1, кодирующих GFP. На ФИГ. 16А показано составное изображение ФИГ. 16В-16Е. На ФИГ. 16В показано окрашивание ядер посредством DAPI. На ФИГ. 16С показана экспрессия GFP. На ФИГ. 16D показано мечение посредством антитела против РСК-альфа биполярных клеток. На ФИГ. 16Е показано мечение посредством антитела против TUJ-1 терминальных ветвей аксонов ганглиев сетчатки.

[0048] На ФИГ. 17А-17D представлены изображения флуоресценции сетчатки глаза африканской зеленой мартышки после введения в стекловидное тело вирионов AAV2.5T.LSV1, кодирующих GFP. На ФИГ. 17А показано составное изображение ФИГ. 17В-17D. На ФИГ. 17В показано окрашивание ядер посредством DAPI. На ФИГ. 17С показана экспрессия GFP. На ФИГ. 17D показано мечение посредством антитела против РСК-альфа биполярных клеток.

[0049] На ФИГ. 18А-18Е представлены изображения флуоресценции сетчатки глаза африканской зеленой мартышки после введения в стекловидное тело вирионов AAV2.5T.LSV1, кодирующих GFP. На ФИГ. 18А показано составное изображение ФИГ. 18В-18Е. На ФИГ. 18В показано окрашивание ядер посредством DAPI. На ФИГ. 18С показана экспрессия GFP. На ФИГ. 18D показано мечение посредством антитела против аррестина колбочек колбочковых фоторецепторных клеток. ФИГ. 18Е показано мечение посредством антитела против родопсина палочковых фоторецепторных клеток.

[0050] На ФИГ. 19А-19Е представлены изображения флуоресценции сетчатки глаза африканской зеленой мартышки после введения в стекловидное тело вирионов AAV2.5T.LSV1, кодирующих GFP. На ФИГ. 19А показано составное изображение ФИГ. 19В-19Е. На ФИГ. 19В показано окрашивание ядер посредством DAPI. На ФИГ. 19С показана экспрессия GFP. На ФИГ. 19D показано мечение посредством антитела против аррестина колбочек колбочковых фоторецепторных клеток. На ФИГ. 19Е показано мечение посредством антитела против родопсина палочковых фоторецепторных клеток.

[0051] На ФИГ. 20А-20Е представлены изображения флуоресценции сетчатки глаза африканской зеленой мартышки после введения в стекловидное тело вирионов AAV2.5T.LSV1, кодирующих GFP. На ФИГ. 20А показано составное изображение ФИГ. 20В-20Е. На ФИГ. 20В показано окрашивание ядер посредством DAPI. На ФИГ. 20С показана экспрессия GFP. На ФИГ. 20D показано мечение посредством антитела против аррестина колбочек колбочковых фоторецепторных клеток. На ФИГ. 20Е показано мечение посредством антитела против родопсина палочковых фоторецепторных клеток.

[0052] На ФИГ. 21А-21Е представлены изображения флуоресценции пигментного эпителия сетчатки (RPE) глаза африканской зеленой мартышки после введения в стекловидное тело вирионов AAV2.5T.LSV1, кодирующих GFP. На ФИГ. 21А показано составное изображение ФИГ. 21В-21Е. На ФИГ. 21В показано окрашивание ядер посредством DAPI. На ФИГ. 21С показана нативная экспрессия GFP без мечения антителом. На ФИГ. 21D показано мечение посредством антитела против RPE 65 колбочковых фоторецепторных клеток. На ФИГ. 21Е показана экспрессия GFP при 647 нм.

[0053] На ФИГ. 22А-22Е представлены изображения флуоресценции пигментного эпителия сетчатки (RPE) глаза африканской зеленой мартышки после введения в стекловидное тело вирионов AAV2.5T.LSV1, кодирующих GFP. На ФИГ. 22А показано составное изображение ФИГ. 22В-22Е. На ФИГ. 22В показано окрашивание ядер посредством DAPI. На ФИГ. 22С показана нативная экспрессия GFP без мечения антителом. На ФИГ. 22D показано мечение посредством антитела против RPE 65 колбочковых фоторецепторных клеток. На ФИГ. 22Е показана экспрессия GFP при 647 нм.

[0054] На ФИГ. 23А-23Е представлены плоскостные изображения флуоресценции пигментного эпителия сетчатки (RPE) глаза африканской зеленой мартышки после введения в стекловидное тело вирионов AAV2.5T.LSV1, кодирующих GFP. На ФИГ. 23А показано составное изображение ФИГ. 23В-23Е. На ФИГ. 23В показано окрашивание ядер посредством DAPI. На ФИГ. 23С показана нативная экспрессия GFP без мечения антителом. На ФИГ. 23D показано мечение посредством антитела против RPE 65 колбочковых фоторецепторных клеток. На ФИГ. 23Е показана экспрессия GFP при 647 нм.

[0055] На ФИГ. 24А-24Е представлены плоскостные изображения флуоресценции пигментного эпителия сетчатки (RPE) глаза африканской зеленой мартышки после

введения в стекловидное тело вирионов AAV2.5T.LSV1, кодирующих GFP. На ФИГ. 24A показано составное изображение ФИГ. 26B-26E. На ФИГ. 24B показано окрашивание ядер посредством DAPI. На ФИГ. 24C показана нативная экспрессия GFP без мечения антителом. На ФИГ. 24D показано мечение посредством антитела против RPE 65 колбочковых фоторецепторных клеток. На ФИГ. 24E показана экспрессия GFP при 647 нм.

[0056] На ФИГ. 25А-25Е представлены плоскостные изображения флуоресценции пигментного эпителия сетчатки (RPE) глаза африканской зеленой мартышки после введения в стекловидное тело вирионов AAV2.5T.LSV1, кодирующих GFP. На ФИГ. 25А показано составное изображение ФИГ. 25В-25Е. На ФИГ. 25В показано окрашивание ядер посредством DAPI. На ФИГ. 25С показана нативная экспрессия GFP без мечения антителом. На ФИГ. 25D показано мечение посредством антитела против RPE 65 колбочковых фоторецепторных клеток. На ФИГ. 25Е показана экспрессия GFP при 647 нм.

[0057] На ФИГ. 26А-26С представлен средний процент положительных по GFP биполярных клеток (ФИГ. 26А), колбочковых клеток (ФИГ. 26В) и клеток RPE (ФИГ. 26С) в различных областях в сетчатке в глазах африканских зеленых мартышек после введения в стекловидное тело вирионов AAV2.5T.LSV1, кодирующих GFP.

[0058] На ФИГ. 27А-27В представлены профили нейтрализующих антител (nAB) против AAV2.5T.LSV1 и AAV2. Пулированные антитела IgG человека (Gammagard IVIG) комбинировали с AAV2.5T.LSV1-CMV-GFP или AAV2-CMV-GFP. Клетки 293Т трансдуцировали смесями и инкубировали в течение 3 суток до измерения экспрессии GFP. На ФИГ. 27А показан профиль нейтрализующих антител IVIG против AAV2.5T.LSV1-CMV-GFP (N=3 для каждого разведения). На ФИГ. 27В показан профиль нейтрализующих антител IVIG против AAV2-CMV-GFP (N= 2 или 3 для каждого разведения).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[0059] Настоящее описание относится к вариантам капсидных белков AAV и к вирионам рекомбинантного аденоассоциированного вируса (AAV), имеющим один или более вариантов капсидных белков ААV. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантные вирионы AAV имеют одну или более из следующих характеристик: 1) увеличенная инфекционность для клеток сетчатки; 2) измененный тропизм; 3) увеличенное связывание с гепарином и/или гепарансульфат-протеогликанами, и/или внутренней пограничной мембраной (ILM); и 4) увеличенная способность к инфекции и/или доставке продукта терапевтического гена через ILM при введении в стекловидное тело, по сравнению с соответствующим вирусным вектором, содержащим его нативный, относящийся типу и/или исходный капсидный дикому модифицированного капсидного белка, описанного в настоящем описании. Настоящее изобретение относится также к фармацевтическим композициям и способам для использования любой из композиций, описанных в настоящем описании, для стимуляции

экспрессии продукта терапевтического гена в клетках, например, клетках сетчатки, у индивидуума, например, для лечения или профилактики заболевания или нарушения.

І. Определения

[0060] Если не определено иное, все технические термины используемые в настоящем описании, имеют такое же значение, какое является общепринятым для специалиста в данной области.

[0061] Терминология, используемая в настоящем описании, представлена только с целью описания конкретных примеров и не предназначена для ограничения. В рамках изобретения, неконкретизированные и конкретизированные формы единственного числа предназначены для включения также форм множественного числа, если контекст явно не указывает на иное. Кроме того, в той степени, в которой термины «включающий», «включает», «имеющий», «имеет», «с» или их варианты использованы в подробном описании и/или в формуле изобретения, такие термины предназначены, чтобы являться включительными, сходным образом с термином «содержащий». Термин «содержащий», в рамках изобретения, является синонимом с «включающий» или «вмещающий», и является включительным или неограничивающим.

[0062] Любая ссылка на «или» в настоящем описании предназначена для включения «и/или», если не указано иное.

[0063] Ссылка на «приблизительное» значение или параметр в настоящем описании включает (и описывает) варианты, относящиеся к этому значению или параметру по существу. Например, описание, относящееся к «приблизительно X» включает описание «X».

[0064] В некоторых вариантах осуществления изобретения, «индивидуум» или «субъект» представляет собой млекопитающее. Млекопитающие включают, но без ограничения, домашних животных (например, коров, овец, кошек, собак и лошадей), приматов (например, людей и нечеловекообразных приматов, таких как обезьяны), кроликов и грызунов (например, мышей и крыс). В конкретных вариантах осуществления, индивидуум или субъект представляет собой человека.

[0065] Термины «лечить», «лечение», «обработка», «облегчать» или «облегчение» и другие грамматические эквиваленты, в рамках изобретения, относятся к смягчению, ослаблению или облегчению офтальмологического заболевания или нарушения, или симптомов офтальмологического заболевания или нарушения, предотвращению симптомов офтальмологического заболевания дополнительных ИЛИ нарушения, ослаблению лежащих в основе метаболических причин симптомов, ингибированию офтальмологического заболевания или нарушения, например, остановке развития офтальмологического заболевания или нарушения, облегчению офтальмологического заболевания или нарушения, вызову регрессии офтальмологического заболевания или нарушения, или остановке симптомов офтальмологического заболевания или нарушения. Термины дополнительно включают достижение терапевтического преимущества. Термин «терапевтическое преимущество» уничтожению или облегчению относится К

офтальмологического заболевания или нарушения, подвергаемого лечению. Также, терапевтическое преимущество достигают с использованием уничтожения или облегчения одного или более из физиологических симптомов, ассоциированных с офтальмологическим заболеванием или нарушением, таким образом, что улучшение наблюдают у пациента, субъекта или индивидуума, несмотря на то, что, в некоторых вариантах осуществления, пациент, субъект, или индивидуум все еще является пораженным офтальмологическим заболеванием или нарушением.

[0066] В некоторых вариантах осуществления, способы по изобретению обеспечивают профилактическое преимущество; например, фармацевтические композиции вводят пациенту, субъекту или индивидууму, подверженному риску развития офтальмологического заболевания или нарушения, или пациенту, субъекту или индивидууму, сообщающему об одном или нескольких из физиологических симптомов офтальмологического заболевания или нарушения, даже если диагноз заболевания или нарушения не поставлен.

[0067] Термины «вводить», «осуществление введения», «введение», и т.п., в рамках изобретения, могут относиться к способам, используемым для обеспечения доставки терапевтических или фармацевтических композиций в желательный участок биологического действия. Эти способы включают инъекцию в стекловидное тело или субретинальную инъекцию в глаз.

[0068] Термины «эффективное количество», «терапевтически эффективное количество» или «фармацевтически эффективное количество», в рамках изобретения, могут относиться к достаточному количеству по меньшей мере одного из вводимых фармацевтической композиции или соединения, которое может облегчать до некоторой степени один или более симптомов офтальмологического заболевания или нарушения, подвергаемого лечению. «Эффективное количество», «терапевтически эффективное количество» или «фармацевтически эффективное количество» фармацевтической композиции можно вводить нуждающемуся в этом субъекту в форме единичной дозы (как более подробно описано в другом месте в настоящем описании).

[0069] Термин «фармацевтически приемлемый», в рамках изобретения, может относиться к материалу, такому как носитель или разбавитель, который не подавляет биологическую активность или свойства соединения, описанного в настоящем описании, и является относительно нетоксичным (т.е., когда материал вводят индивидууму, он как не вызывает нежелательные биологические эффекты, так и не взаимодействует опасным образом с любым из компонентов композиции, в которой он содержится).

[0070] Термин «фармацевтическая композиция», в рамках изобретения, может относиться к биологически активному соединению, необязательно, смешанному по меньшей мере с одним фармацевтически приемлемым химическим компонентом, таким как, хотя и без ограничения, носители, стабилизаторы, разбавители, диспергирующие средства, суспендирующие средства, загустители, наполнители и т.п.

[0071] «ААV вектор» или «гААV вектор», в рамках изобретения, относится к аденоассоциированному вирусному (ААV) вектору или рекомбинантному ААV (гААV) вектору, содержащему полинуклеотидную последовательность, не происходящую из ААV (например, полинуклеотид, гетерологичный для ААV, такой как последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая терапевтический трансген, например, афлиберцепт), для трансдукции клетки-мишени или ткани-мишени. Как правило, гетерологичный полинуклеотид фланкирован по меньшей мере одной, и как правило, двумя, последовательностями инвертированного концевого повтора (ITR) ААV. Термин гААV вектор включает как гААV векторные частицы, так и гААV векторные плазмиды. гААV вектор может являться либо одноцепочечным (оцААV), либо самокомплементарным (скААV).

[0072] «ААV вирус» или «ААV вирусная частица» или «гААV векторная частица» или «гААV частица» или «рекомбинантный вирион ААV» относится к вирусной частице, содержащей по меньшей мере один капсидный белок ААV и полинуклеотидный гААV вектор. Если частица содержит гетерологичный полинуклеотид (например, полинуклеотид, отличный от генома ААV дикого типа, например, трансген для доставки в клетку-мишень или ткань-мишень), его, как правило, обозначают как «гААV векторная частица» или «гААV вектор».

[0073] Термин «упаковка», в рамках изобретения, может относиться к сериям внутриклеточных событий, которые могут приводить к сборке и капсидированию частицы rAAV.

[0074] **AAV** Гены «rep» И «cap» относятся К полинуклеотидным последовательностям, кодирующим белки репликации И капсидирования аденоассоциированного вируса. rep и сар AAV обозначены в настоящем описании как «гены упаковки» AAV.

[0075] Термины «полипептид» или «белок» используют взаимозаменяемо в настоящем описании для обозначения полимеров аминокислот любой длины. Полимер может являться линейным или разветвленным, он может содержать модифицированные аминокислоты, и он может прерываться не аминокислотами. Термины также включают аминокислотный полимер, который был модифицирован естественным образом или посредством вмешательства; например, посредством образования дисульфидной связи, гликозилирования, липидирования, ацетилирования, фосфорилирования, или любой другой манипуляции или модификации, такой как конъюгация с метящим компонентом или токсином. Также включены в определение, например, полипептиды, содержащие один или более аналогов аминокислот (включая, например, неприродные аминокислоты и т.д.), так же как другие модификации, известные в данной области.

[0076] Термин «полинуклеотид» относится к полимерной форме нуклеотидов любой длины, включая дезоксирибонуклеотиды или рибонуклеотиды, или их аналоги. Полинуклеотид может содержать модифицированные нуклеотиды, такие как метилированные нуклеотиды и аналоги нуклеотидов, и может прерываться

ненуклеотидными компонентами. Если они присутствуют, модификации структуры нуклеотида можно вводить до или после сборки полимера. Термин полинуклеотид, в рамках изобретения, может относиться к двух- и одноцепочечным молекулам.

[0077] В рамках изобретения, «рекомбинантный» может относиться к биомолекуле, например, гену или белку, который (1) удален из его природного окружения, (2) не ассоциирован со всем или частью полинуклеотида, в котором ген обнаружен в природе, (3) функционально связан с полинуклеотидом, с которым он не связан в природе, или (4) не встречается в природе. Термин «рекомбинантный» можно использовать, применительно к изолятам клонированной ДНК, химически синтезированным аналогам полинуклеотидов или аналогам полинуклеотидов, биологически синтезированным посредством гетерологичных систем, так же как к белкам и/или мРНК, кодированным такими нуклеиновыми кислотами. Таким образом, например, белок, синтезированный микроорганизмом, является рекомбинантным, например, если он синтезирован с мРНК, синтезированной с рекомбинантного гена, присутствующего в клетке.

[0078] Термин «продукт гена против VEGF» включает любое лекарственное средство, включая белки, полипептиды, пептиды, слитый белок, мультимерные белки, антитело, человеческое моноклональные антитело, фрагмент антитела, аптамер, ингибитор киназы, рецептор или фрагмент рецептора, или молекулу нуклеиновой кислоты, которые могут уменьшать, создавать помехи, нарушать, блокировать и/или ингибировать активность или функцию эндогенного VEGF и/или эндогенного рецептора VEGF (VEGFR), или взаимодействие или путь VEGF-VEGFR in vivo. Продукт гена против VEGF может представлять собой любой из известных продуктов терапевтических генов, которые могут уменьшать рост или формирование нового кровеносного сосуда, и/или отек, или набухание, при доставке в клетку, ткань или субъекту in vivo, например, ранибизумаб, бролуцизумаб или бевацизумаб. В некоторых вариантах осуществления, продукт гена против VEGF может являться природным, неприродным или синтетическим. В некоторых вариантах осуществления, продукт гена против VEGF может происходить из природной молекулы, которая впоследствии подвергнута модификации или мутагенезу для придания активности против VEGF. В некоторых вариантах осуществления, продукт гена против VEGF представляет собой слитый или химерный белок. В таких белках, функциональные домены или полипептиды искусственным образом слиты с группой или полипептидом для получения слитого или химерного белка, который секвестрировать VEGF in vivo или функционировать в качестве ловушки VEGFR. В некоторых вариантах осуществления, продукт гена против VEGF представляет собой слитый или химерный белок, который блокирует взаимодействие эндогенного VEGFR с его лигандами.

[0079] В рамках изобретения, «VEGF» может относиться к любой изоформе VEGF или члену семейства VEGF, если не требуется иного, включая, но без ограничения, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F, фактор роста плаценты (PGF) или любую их комбинацию, или любой их функциональный фрагмент или вариант. В рамках

изобретения, «рецептор VEGF» или «VEGFR», или «VEGF-R» может быть использован для обозначения любого из рецепторов VEGF, включая, но без ограничения, VEGFR-1 (или Flt-1), VEGFR-2 (или Flk-1/KDR) и VEGFR-3 (или Flt-4). VEGFR может представлять собой связанную с мембраной или растворимую форму, или функциональный фрагмент или укороченную форму рецептора.

[0080] В рамках изобретения «белок sFlt-1» относится к полипептидной последовательности или ее функциональному фрагменту, по меньшей мере с 90%, или более, гомологии с природной последовательностью sFLT-1 человека, таким образом, что белок или полипептид sFlt-1 связывается с VEGF и/или рецептором VEGF, если явно не указано иное. Гомология относится к % консервативности остатков в выравнивании между двумя последовательностями. Природный белок sFLT-1 человека может включать любые пригодные варианты sFLT-1, включая, но без ограничения, функциональные фрагменты, последовательности, содержащие вставки, делеции, псевдофрагменты, искусственно псевдогены, варианты сплайсинга или оптимизированные последовательности.

[0081] «Оперативно связанный» или «функционально связанный», или «связанный» могут относиться к непосредственному соседству генетических элементов, где элементы находятся в взаимосвязи, позволяющей им функционировать ожидаемым образом. Например, промотор может являться функционально связанным с кодирующей областью, если промотор инициации транскрипции кодирующей помогает последовательности. Могут присутствовать промежуточные остатки между промотором и кодирующей областью, при условии, что эта функциональная взаимосвязь сохраняется.

[0082] «Экспрессирующий вектор», в рамках изобретения, включает вектор, например, плазмиду, миникольцо, вирусный вектор, липосому и т.п. как обсуждают выше или как известно в данной области, содержащие полинуклеотид, который кодирует представляющий интерес продукт гена, и который используют для осуществления экспрессии белка в намеченной клетке-мишени. Экспрессирующий вектор может также содержать контрольные элементы, функционально связанные с кодирующей областью, для облегчения экспрессии продукта гена в мишени. Комбинацию контрольных элементов, например, промоторов, энхансеров, UTR, нацеливающих на мкРНК последовательностей и т.д., и гена или генов, с которыми они функционально связаны для экспрессии, иногда обозначают как «экспрессирующая кассета». Большое количество таких контрольных элементов являются известными и доступными в данной области или могут быть легко сконструированы из компонентов, доступных в данной области.

[0083] «Продукт гена» представляет собой молекулу, возникающую в результате экспрессии конкретного гена. Продукты генов включают, например, полипептид, аптамер, интерферирующую РНК, мРНК и т.п.. В конкретных вариантах осуществления, «продукт гена» представляет собой полипептид, пептид, белок или интерферирующую РНК, включая малую интерферирующую РНК (миРНК), мкРНК или короткошпилечную РНК

(кшРНК). В конкретных вариантах осуществления, продукт гена представляет собой продукт терапевтического гена, например, терапевтический белок.

[0084] Термин «гетерологичный» может относиться к объекту, генотипически отличному от остальных объектов, с которыми его сравнивают. Например, полинуклеотид, введенный посредством способов генной инженерии в плазмиду или вектор, полученные из отличного вида, может представлять собой гетерологичный полинуклеотид. Промотор, удаленный из своей природной кодирующей последовательности и функционально связанный с кодирующей последовательностью, связанным с которой его не обнаруживают в природе, представляет собой гетерологичный промотор.

[0085] В способах, композициях и наборах, описанных в настоящем описании, можно использовать, если не указано иное, способы и описания, общепринятые в молекулярной биологии (включая рекомбинантные способы), клеточной биологии, биохимии, иммунохимии, и офтальмологические способы, находящиеся в компетенции специалиста в данной области. Такие общепринятые способы включают способы наблюдения и анализа сетчатки или зрения у субъекта, клонирования и размножения рекомбинантного вируса, составления фармацевтической композиции и биохимической очистки, и иммунохимии. Конкретные иллюстрации пригодных способов можно получить со ссылкой на примеры в настоящем описании. Однако, эквивалентные общепринятые способы, разумеется, также можно использовать. Такие общепринятые способы и описания можно обнаружить в таких стандартных руководствах, как Green, et al., Eds., Genome Analysis: A Laboratory Manual Series (Vols. I-IV) (1999); Weiner, et al., Eds., Genetic Variation: A Laboratory Manual (2007); Dieffenbach, Dveksler, Eds., PCR Primer: A Laboratory Manual (2003); Bowtell and Sambrook, DNA Microarrays: A Molecular Cloning Manual (2003); Mount, Bioinformatics: Sequence and Genome Analysis (2004); Sambrook and Russell, Condensed Protocols from Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2006); и Sambrook and Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2002) (BCE of Cold Spring Harbor Laboratory Press); Stryer, L., Biochemistry (4th Ed.) W.H. Freeman, N.Y. (1995); Gait, «Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach» IRL Press, London (1984); Nelson and Cox, Lehninger, Principles of Biochemistry, 3rd Ed., W.H. Freeman Pub., New York (2000); и Berg et al., Biochemistry, 5th Ed., W.H. Freeman Pub., New York (2002), полное содержание каждого из которых приведено в настоящем описании в качестве ссылки для всех целей.

[0086] «Вариант капсидного белка AAV», в рамках изобретения, относится к капсидному белку AAV, содержащему по меньшей мере одно отличие аминокислоты (например, замену аминокислоты, вставку аминокислоты, делецию аминокислоты), относительно соответствующего исходного капсидного белка AAV, где капсидный белок AAV не соответствует аминокислотной последовательности, присутствующей в природном капсидном белке AAV. В некоторых вариантах осуществления, вариант капсидного белка AAV обеспечивает увеличенное связывание с гепарином и/или гепарансульфат-протеогликаном, по сравнению со связыванием вириона AAV,

содержащего соответствующий исходный капсидный белок AAV. В конкретных вариантах осуществления, вариант капсидного белка AAV обеспечивает: а) увеличенную инфекционность для клеток сетчатки, по сравнению с инфекционностью для клеток сетчатки вириона AAV, содержащего соответствующий исходный капсидный белок AAV; b) измененный клеточный тропизм, по сравнению с тропизмом вириона AAV, содержащего соответствующий исходный капсидный белок AAV; и/или с) увеличенную способность связывать и/или пересекать ILM, по сравнению с вирионом AAV, содержащим соответствующий исходный капсидный белок AAV.

[0087] «Модифицированная последовательность», в рамках изобретения, относится к последовательности, содержащей одну или более замен, вставок и/или делеций, по сравнению с соответствующей последовательностью исходного AAV или исходного капсидного белка AAV.

[0088] «Вирус-помощник» для AAV относится к вирусу, позволяющему AAV (например, AAV дикого типа) подвергаться репликации и упаковке посредством клетки млекопитающего. Множество таких вирусов-помощников для AAV известны в данной области, включая аденовирусы, вирусы герпеса и поксвирусы, такие как вирус осповакцины. Аденовирусы включают ряд различных подгрупп, хотя аденовирус типа 5 из подгруппы С является наиболее общеупотребительным. Многочисленные аденовирусы, полученные от человека, не относящихся к человеку млекопитающих и птиц, известны и доступны из депозитариев, таких как ATCC. Вирусы семейства герпеса включают, например, вирусы простого герпеса (HSV) и вирусы Эпштейна-Барр (EBV), так же как цитомегаловирусы (CMV) и вирусы псевдобешенства (PRV); которые также доступны из депозитариев, таких как ATCC.

[0089] «Функция(функции) помощника» относится к функции(функциям), кодированным в геноме вируса-помощника, которые позволяют репликацию и упаковку AAV (в сочетании с другими требованиями к репликации и упаковке, описанными в настоящем описании). Как описано в настоящем описании, «функцию помощника» можно обеспечивать рядом способов, включая предоставление вируса-помощника или предоставление, например, полинуклеотидных последовательностей, кодирующих необходимую функцию(функции), в транс-положении для клетки-продуцента. Например, плазмидным или другим экспрессирующим вектором, содержащим нуклеотидные последовательности, кодирующие один или более аденовирусных белков, трансфицируют клетку-продуцента, вместе с гААV вектором.

[0090] «Инфекционные» вирус или вирусная частица представляют собой те, которые содержат компетентно собранный вирусный капсид и являются способными к доставке полинуклеотидного компонента в клетку, для которой вид вируса является тропным. Термин не обязательно включает какую-либо способность к репликации вириона. Анализы для подсчета инфекционных вирионов описаны в другом месте в настоящем описании и в литературе в данной области. Вирусную инфекционность можно выражать как соотношение инфекционных вирионов к общему количеству вирионов.

Способы определения соотношения инфекционных вирионов к общему количеству вирионов известны в данной области. См., например, Grainger et al. (2005) Mol. Ther. 11:S337 (описывающий анализ инфекционного титра TCID50); и Zolotukhin et al. (1999) Gene Ther. 6:973.

II. ВАРИАНТЫ КАПСИДНЫХ БЕЛКОВ AAV

[0091] Настоящее изобретение относится к вариантам капсидных белков аденоассоциированного вируса (AAV). В некоторых вариантах осуществления, вариант капсидного белка AAV, описанный в настоящем описании, содержит модифицированную последовательность, содержащую одну или более аминокислотных замен в пределах аминокислотных остатков 570-579, относительно исходного капсидного белка AAV, где модифицированная последовательность содержит HKFKSGD (SEQ ID NO: 1), и где нумерация аминокислотных остатков соответствует капсидному белку VP1 AAV5. В некоторых вариантах осуществления, вариант капсидного белка ААУ содержит модифицированную последовательность, содержащую одну или более аминокислотных замен в пределах аминокислотных остатков 570-579, относительно исходного капсидного белка AAV, где модифицированная последовательность содержит X₁X₂HKFKSGDX₃ (SEQ ID NO: 2), и где нумерация аминокислотных остатков соответствует капсидному белку VP1 AAV5, где X_{1-3} может независимо представлять собой любую аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления, каждый из X_{1-3} независимо выбран из A, L, G, S и T. В некоторых вариантах осуществления, каждый из X₁₋₃ независимо выбран из A, L, G, S и Т. В некоторых вариантах осуществления, Х₁ представляет собой L. В некоторых вариантах осуществления, X_2 представляет собой А. В некоторых вариантах осуществления, Х₃ представляет собой А. В некоторых вариантах осуществления, вариант капсидного белка AAV содержит модифицированную последовательность, содержащую одну или более аминокислотных замен в пределах аминокислотных остатков 570-579, относительно исходного капсидного белка AAV. где модифицированная последовательность содержит LAHKFKSGDA (SEQ ID NO: 3), последовательность, имеющую по меньшей мере 80% или по меньшей мере 90% гомологию с SEQ ID NO: 3; имеющую по меньшей мере 80% или по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 3; или имеющую четыре или более, пять или более, шесть или более, семь или более, восемь или более, или девять или более последовательных аминокислот в SEQ ID NO: 3, и где нумерация аминокислотных остатков соответствует капсидному белку VP1 AAV5. В некоторых вариантах осуществления, модифицированная последовательность содержит LAHKFKSGDA (SEQ ID NO: 3).

[0092] В то время как в настоящем описании приведена ссылка на аминокислотные модификации капсидных белков (включая специфические замены и вставки аминокислот) с использованием нумерации аминокислот, соответствующей капсидному белку VP1 AAV5, понятно, что любую из этих аминокислотных модификаций можно также вводить в капсидный белок AAV из других серотипов, например, в положениях, соответствующих

положениям VP1 AAV5. Последовательности белков AAV разделяют значительную гомологию и сходную нумерацию аминокислот, и специалист в данной области может легко определять аминокислотные остатки в других серотипах AAV, которые соответствуют остаткам, конкретно описанным в настоящем описании для VP1 AAV5.

[0093] В некоторых вариантах осуществления, исходный капсидный белок AAV представляет собой капсидный белок AAV дикого типа, например, капсидный белок AAV типа 1 (AAV1), AAV типа 2 (AAV2), AAV типа 3 (AAV3), AAV типа 4 (AAV4), AAV типа 5 (AAV5), AAV типа 6 (AAV6), AAV типа 7 (AAV7), AAV типа 8 (AAV8), птичьего AAV, бычьего AAV, собачьего AAV, лошадиного AAV, AAV приматов, не относящегося к приматам AAV или овечьего AAV. В некоторых вариантах осуществления, исходный капсидный белок AAV представляет собой капсидный белок AAV5. В некоторых вариантах осуществления, исходный капсидный белок AAV представляет собой капсидный белок AAV представляет собой капсидный белок VP1, VP2 или VP3. В некоторых вариантах осуществления, исходный капсидный белок AAV представляет собой капсидный белок VP1 AAV5.

[0094] В некоторых вариантах осуществления, исходный капсидный белок AAV представляет собой вариант капсидного белка AAV. В некоторых вариантах осуществления, исходный капсидный белок AAV представляет собой вариант капсидного белка AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, птичьего AAV, бычьего AAV, собачьего AAV, лошадиного AAV, AAV приматов, не относящегося к приматам AAV или овечьего AAV. В некоторых вариантах осуществления, исходный капсидный белок AAV представляет собой вариант капсидного белка VP1 AAV5. В некоторых вариантах осуществления, исходный капсидный белок AAV представляет собой вариант капсидного белка VP1 AAV5, имеющий по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% гомологию с SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления, исходный капсидный белок AAV представляет собой вариант капсидного белка VP1 AAV5, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления, исходный капсидный белок AAV представляет собой гибридный капсидный белок. В некоторых вариантах осуществления, исходный капсидный белок AAV представляет собой гибрид капсидного белка AAV2 и капсидного белка AAV5. В некоторых вариантах осуществления, исходный капсидный белок AAV представляет собой капсидный белок AAV2.5T или его вариант, имеющий по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% гомологию с капсидным белком AAV2.5T. В некоторых вариантах осуществления, исходный капсидный белок AAV представляет собой капсидный белок AAV 2.5Т или его вариант, имеющий по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с капсидным белком AAV2.5T. В некоторых осуществления, исходный капсидный белок AAV представляет собой капсидный белок AAV 2.5T. В некоторых вариантах осуществления, исходный капсидный белок AAV представляет собой капсидный белок VP1, VP2 или VP3. В некоторых вариантах осуществления, исходный капсидный белок AAV представляет собой капсидный белок VP1 AAV2.5T или его вариант, имеющий по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% гомологию с капсидным белком VP1 AAV2.5T (SEQ ID NO: 5). В некоторых вариантах осуществления, исходный капсидный белок AAV представляет собой капсидный белок VP1 AAV2.5T или его вариант, имеющий по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с капсидным белком VP1 AAV2.5T (SEQ ID NO: 5).

[0095] В некоторых вариантах осуществления, вариант капсидного белка ААV содержит капсидную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% гомологию с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления, вариант капсидного белка AAV содержит капсидную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления, вариант капсидного белка AAV содержит капсидную последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% гомологию с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления, вариант капсидного белка AAV содержит капсидную последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, или 100% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления, вариант капсидного белка AAV содержит SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления, вариант капсидного белка AAV содержит SEQ ID NO: 7.

[0096] В конкретных вариантах осуществления, вариант капсидного белка ААУ, когда присутствует в рекомбинантном вирионе AAV, обеспечивает увеличенную инфекционность для клеток сетчатки по сравнению с инфекционностью для клеток сетчатки рекомбинантного вириона AAV, содержащего соответствующий исходный капсидный белок AAV. В конкретных вариантах осуществления, вариант капсидного белка AAV, когда присутствует в рекомбинантном вирионе AAV, обеспечивает увеличенную инфекционность для клеток сетчатки при введении посредством инъекции в стекловидное тело, по сравнению с инфекционностью для клеток сетчатки рекомбинантного вириона AAV, содержащего соответствующий исходный капсидный белок AAV при введении посредством инъекции в стекловидное тело. В некоторых вариантах осуществления, клетка сетчатки представляет собой одну или более из фоторецепторной клетки (например, палочек; колбочек), ганглионарной клетки сетчатки (RGC), клетки пигментного эпителия сетчатки (RPE), клетки Мюллера, амакриновой клетки, биполярной клетки и горизонтальной клетки. В конкретных вариантах

осуществления, вариант капсидного белка AAV, когда присутствует в рекомбинантном вирионе AAV, придает измененный тропизм рекомбинантному вириону AAV по сравнению с тропизмом рекомбинантного вириона AAV, содержащего соответствующий исходный капсидный белок AAV. В конкретных вариантах осуществления, вариант капсидного белка AAV, когда присутствует в рекомбинантном вирионе AAV, обеспечивает увеличенное связывание с гепарином и/или гепарансульфатом, и/или увеличенную способность связывать и пересекать внутреннюю пограничную мембрану (ILM) после инъекции в стекловидное тело, по сравнению с рекомбинантным вирионом AAV, содержащим соответствующий исходный капсидный белок AAV.

III. ПОЛИНУКЛЕОТИДЫ И КЛЕТКИ

[0097] Настоящее изобретение относится также к полинуклеотидам, кодирующим один или более вариантов капсидных белков AAV, описанных в настоящем описании. В вариантах осуществления, полинуклеотид конкретных представляет экспрессирующий вектор. В некоторых вариантах осуществления, экспрессирующий полинуклеотидную содержит последовательность, кодирующую вектор модифицированный капсидный белок, описанный в настоящем описании, функционально связанную промоторной последовательностью, например, промоторной последовательностью, управляющей экспрессией полинуклеотида в клетке. В конкретных вариантах осуществления, клетка представляет собой клетку-хозяина. Клетку-хозяина можно использовать для продукции вирионов, содержащих модифицированный капсидный белок. Иллюстративные клетки-хозяева включают клетки млекопитающих (например, клетки HEK293), клетки насекомых (например, клетки SF9), микроорганизмы и дрожжи. В некоторых вариантах осуществления, клетка содержит ген гер ААV, такой как ген гер AAV, который кодирует белок гер AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, птичьего AAV, бычьего AAV, собачьего AAV, лошадиного AAV, AAV приматов, не относящегося к приматам AAV или овечьего AAV, или его вариант. В некоторых вариантах осуществления, ген гер AAV стабильно поддерживается в клетке.

[0098] Настоящее изобретение относится также к клеткам, содержащим модифицированный капсидный белок, полинуклеотид или вектор, кодирующий описанный настоящем описании. В конкретных вариантах осуществления, полинуклеотид представляет собой экспрессирующий вектор, и экспрессирующий вектор содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую вариант капсида, настоящем описании, функционально связанную с промоторной описанный промоторной последовательностью, управляющей последовательностью, например, экспрессией полинуклеотида в клетке. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид или вектор стабильно поддерживается в клетке. В некоторых вариантах осуществления, клетка дополнительно содержит ген rep AAV. В некоторых вариантах осуществления, ген гер AAV стабильно поддерживается в клетке. В конкретных вариантах осуществления, полинуклеотид или вектор дополнительно содержит последовательность, кодирующую белок гер, например, белок гер AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, птичьего AAV, бычьего AAV, собачьего AAV, лошадиного AAV, AAV приматов, не относящегося к приматам AAV или овечьего AAV, или его вариант.

[0099] В некоторых вариантах осуществления, клетка дополнительно содержит полинуклеотидную кассету, содержащую последовательность, кодирующую продукт гена, например, продукт терапевтического гена, такой как продукт терапевтического гена, описанный настоящем описании. \mathbf{B} конкретных вариантах полинуклеотидная кассета фланкирована инвертированными одним или более инвертированными концевыми повторами (ITR) AAV. В конкретных вариантах осуществления, полинуклеотидная кассета фланкирована на 5'- и 3'-концах ITR AAV. В некоторых вариантах осуществления, один или более ITR представляют собой ITR AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, птичьего AAV, бычьего AAV, собачьего AAV, лошадиного AAV, AAV приматов, не относящегося к приматам AAV или овечьего AAV, или их варианты. В некоторых вариантах осуществления, один или более ITR представляют собой ITR AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, птичьего AAV, бычьего AAV, собачьего AAV, лошадиного AAV, AAV приматов, не относящегося к приматам AAV или овечьего AAV. В некоторых вариантах осуществления, один или более ITR представляют собой ITR AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, птичьего AAV, бычьего AAV, собачьего AAV, лошадиного AAV, AAV приматов, не относящегося к приматам AAV или овечьего AAV, содержащие одну или более вставок, делеций и/или замен нуклеотидов.

IV. ВИРИОНЫ И СПОСОБЫ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ

[0100] Настоящее изобретение относится также к вирионам, например, рекомбинантным вирионам AAV, содержащим вариант капсидного белка AAV, описанный в настоящем описании.

[0101] В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантный вирион AAV дополнительно содержит полинуклеотидную кассету, содержащую последовательность, кодирующую продукт гена, например, продукт терапевтического гена, такой как продукт терапевтического гена, описанный в настоящем описании. В конкретных вариантах осуществления, полинуклеотидная кассета фланкирована одним более инвертированными концевыми повторами (ITR) AAV, такими как ITR AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, птичьего AAV, бычьего AAV, собачьего AAV, лошадиного AAV, AAV приматов, не относящегося к приматам AAV или овечьего AAV. или ИХ варианты. В конкретных вариантах осуществления, полинуклеотидная кассета фланкирована на 5'- и 3'-концах ITR AAV. В некоторых вариантах осуществления, один или более ITR представляют собой ITR AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, птичьего AAV, бычьего AAV, собачьего AAV, лошадиного AAV, AAV приматов, не относящегося к приматам AAV или

овечьего AAV, или их варианты. В некоторых вариантах осуществления, один или более ITR представляют собой ITR AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, птичьего AAV, бычьего AAV, собачьего AAV, лошадиного AAV, AAV приматов, не относящегося к приматам AAV или овечьего AAV, содержащие одну или более вставок, делеций и/или замен нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления, один или более ITR представляют собой ITR AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, птичьего AAV, бычьего AAV, собачьего AAV, лошадиного AAV, AAV приматов, не относящегося к приматам AAV или овечьего AAV.

[0102] В конкретных вариантах осуществления, продукт гена ингибирует неоваскуляризацию, например, хориоидальную неоваскуляризацию (CNV), в сетчатке субъекта. Обнаружено, что многие клеточные факторы играют важные роли в регуляции образования CNV, среди которых могут быть включены, но без ограничения, фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), рецептор VEGF (VEGFR), тромбоцитарный фактор роста (PDGF), индуцируемый гипоксией фактор (HIF), ангиопоэтин (Ang) и другие цитокины, активируемые митогеном протеинкиназы (MAPK). В некоторых вариантах осуществления, продукт гена представляет собой ингибитор одного или более из VEGF, VEGFR, PDGF, HIF, Ang и MAPK.

[0103] В конкретных вариантах осуществления, продукт гена ингибирует неоваскуляризацию, например, хориоидальную неоваскуляризацию (CNV), в сетчатке субъекта. Обнаружено, что многие клеточные факторы играют важные роли в регуляции образования CNV, среди которых могут быть включены, но без ограничения, фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), рецептор VEGF (VEGFR), тромбоцитарный фактор роста (PDGF), индуцируемый гипоксией фактор (HIF), ангиопоэтин (Ang) и другие цитокины, и активируемые митогеном протеинкиназы (MAPK). В некоторых вариантах осуществления, продукт гена представляет собой ингибитор одного или более из VEGF, VEGFR, PDGF, HIF, Ang и MAPK.

[0104] В некоторых вариантах осуществления, продукт гена представляет собой интерферирующую РНК, аптамер или белок. В некоторых вариантах осуществления, продукт терапевтического гена представляет собой интерферирующую РНК, аптамер или белок. осуществления, (или некоторых вариантах продукт терапевтического гена) представляет собой миРНК, мкРНК или белок. В некоторых осуществления, продукт гена (или продукт терапевтического гена) представляет собой сайт-специфическую нуклеазу, обеспечивающую сайт-специфический нокдаун функции гена. В некоторых вариантах осуществления, продукт гена (или продукт терапевтического гена) представляет собой интерферирующую РНК. В некоторых вариантах осуществления, продукт гена (или продукт терапевтического представляет собой миРНК или мкРНК.

[0105] В некоторых вариантах осуществления, продукт гена (или продукт терапевтического гена) представляет собой продукт гена против VEGF. В некоторых вариантах осуществления, продукт гена (или продукт терапевтического гена)

представляет собой интерферирующую РНК против VEGF. В некоторых вариантах осуществления, продукт гена (или продукт терапевтического гена) представляет собой миРНК или мкРНК против VEGF.

[0106] В некоторых вариантах осуществления, продукт гена (или продукт терапевтического гена) представляет собой аптамер. Иллюстративные представляющие интерес аптамеры включают аптамер против фактора роста эндотелия сосудов (VEGF). См., например, Ng et al. (2006) Nat. Rev. Drug Discovery 5:123; и Lee et al. (2005) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102:18902. Также пригодным для использования является специфический для PDGF аптамер, например, E10030; см., например, Ni and Hui (2009) Ophthalmologica 223:401; и Akiyama et al. (2006) J. Cell Physiol. 207:407).

[0107] В некоторых вариантах осуществления, продукт гена (или продукт терапевтического гена) представляет собой белок. Белок, как правило, представляет собой белок, усиливающий функцию клетки сетчатки, например, функцию палочковой или колбочковой фоторецепторной клетки, ганглионарной клетки сетчатки, клетки Мюллера, биполярной клетки, амакриновой клетки, горизонтальной клетки или клетки пигментного эпителия сетчатки. Иллюстративные белки включают нейропротективные полипептиды (например, GDNF, CNTF, NT4, NGF и NTN); антиангиогенные полипептиды (например, растворимый рецептор фактора роста эндотелия сосудов (VEGF); связывающее VEGF антитело; связывающий VEGF фрагмент антитела (например, одноцепочечное антитело против VEGF); эндостатин; тумстатин; ангиостатин; растворимый белок Flt (Lai et al. (2005) Mol. Ther. 12:659); слитый белок Fc, содержащий растворимый белок Flt (см., например, Pechan et al. (2009) Gene Ther. 16:10); фактор пигментного эпителия (PEDF); растворимый рецептор Tie-2; etc.); тканевый ингибитор металлопротеиназ-3 (TIMP-3); опсин, например, родопсин; антиапоптотические полипептиды (например, Bc1-2, Bc1-X1); И Т.П. Пригодные полипептиды включают, но без ограничения, глиальный нейротрофический фактор (GDNF); фактор роста фибробластов 2; нейртурин (NTN); цилиарный нейротрофический фактор (CNTF); фактор роста нервов (NGF); нейтрофин-4 (NT4); нейротрофический фактор головного мозга (BDNF); эпидермальный фактор роста; родопсин; X-сцепленный ингибитор апоптоза; и Sonic hedgehog.

[0108] Пригодные опсины включают, например, светочувствительный опсин, как описано в Публикации патента США No. 2007/0261127 (например, ChR2; Chop2); Публикации патента США No. 2001/0086421; Публикации патента США No. 2010/0015095; и Diester et al. (2011) Nat. Neurosci. 14:387.

[0109] Пригодные белки также включают ретиношизин. Пригодные полипептиды включают, например, белок-1, взаимодействующий с регулятором ГТФазы при пигментном ретините (RGPR) (см., например, No. доступа в GenBank Q96KN7, Q9EPQ2 и Q9GLM3); периферин-2 (Prph2) (см., например, No. доступа в GenBank NP_000313; и Travis et al. (1991) Genomics 10:733); периферин; специфический для пигментного эпителия сетчатки белок (RPE65) (см., например, GenBank AAC39660; и Morimura et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:3088); и т.п.

- [0110] Пригодные белки также включают: СНМ (белок хороидеремии (сопровождающий Rab белок 1)), полипептид, который, когда является дефектным или отсутствующим, вызывает хороидеремию (см., например, Donnelly et al. (1994) Hum. Mol. Genet. 3:1017; и van Bokhoven et al. (1994) Hum. Mol. Genet. 3:1041); и гомолог 1 Crumbs (СRB 1), полипептид, который, когда является дефектным или отсутствующим, вызывает врожденный амавроз Лебера и пигментный ретинит (см., например, den Hollander et al. (1999) Nat. Genet. 23:217; и No. доступа в GenBank CAM23328).
- [0111] Пригодные белки также включают белки, которые, когда являются дефектными или отсутствующими, приводят к ахроматопсии, где такие полипептиды включают, например, альфа-субъединицу управляемого цГМФ катионного канала фоторецепторных колбочек (CNGA3) (см., например, No. доступа в GenBank NP_001289; и Вооіј et al. (2011) Ophthalmology 118:160-167); бета-субъединицу управляемого цГМФ катионного канала фоторецепторных колбочек (CNGB3) (см., например, Kohl et al.(2005) Ешг J Ниш Genet. 13(3):302); связывающий гуаниновые нуклеотиды белок (G-белок); полипептид 2 с активностью альфа-трансдукции (GNAT2) (АСНМ4); и АСНМ5; и полипептиды, которые, когда являются дефектными или отсутствующими, приводят к различным формам цветовой слепоты (например, L-опсин, M-опсин и S-опсин). См. Мапсизо et al. (2009) Nature 461(7265):784-787.
- [0112] В некоторых вариантах осуществления, продукт гена (или продукт терапевтического гена) представляет собой белок против VEGF. В некоторых вариантах осуществления, белок против VEGF представляет собой белок sFlt-1 или его фрагмент, или антитело против VEGF или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления, белок против VEGF представляет собой антитело против VEGF или его фрагмент, такое как афлиберцепт, ранибизумаб и бевацизумаб или их фрагменты. В некоторых вариантах осуществления, белок против VEGF представляет собой белок sFlt-1.
- [0113] Растворимая укороченная форма рецептора VEGF FLT-1, sFLT-1, является единственным известным эндогенным специфическим ингибитором VEGF. В природе, она образуется посредством альтернативного сплайсинга мРНК и лишена ближайшего к мембране иммуноглобулиноподобного домена, трансмембранной области и внутриклеточного домена тирозинкиназы. Структурно, белки FLT-1 и sFLT-1 оба могут содержать множество функциональных доменов. В некоторых вариантах, белки FLT и sFLT разделяют 6 общих связанных между собой доменов; 3 домена, вовлеченные в димеризацию белка, и 3 домена, вовлеченные в связывание лиганда, такого как VEGF. sFLT-1 не является ограниченным клеточной мембраной. Несвязанный sFLT-1 может свободно диффундировать в внеклеточное пространство или раствор.
- [0114] Взаимодействие между sFLT-1 и рецептором VEGF является специфическим и может быть прекращено при конкуренции с 100-кратным избытком немеченого VEGF. В некоторых случаях, ангиостатическая активность sFLT-1 может возникать в результате ингибирования VEGF посредством двух механизмов: i) секвестрирования VEGF, с которым он связывается с высокой аффинностью, и ii)

формирования неактивных гетеродимеров с пересекающими мембрану изоформами рецепторов VEGF FLTt-1 и FLK-1/KDR. Как известно в данной области, анализы связывания in vitro показали, что sFLT-1 связывает VEGF с высокой аффинностью и может также ингибировать управляемую VEGF пролиферацию эндотелиальных клеток пупочной вены человека. В моделях злокачественных опухолей на животных, sFLT-1 ингибирует рост опухоли. В некоторых случаях, sFLT-1 может функционировать субстехиометрическим или доминантно негативным образом, поскольку для избытка VEGF в внеклеточном пространстве может быть предотвращено связывание и последующая активация рецептора VEGF. Эти свойства sFLT-1 описаны в Kendall and Thomas, 1993; Proc Natl Acad Sci. 90: 10705-10709, полное содержание которого приведено в настоящем описании в качестве ссылки. Функциональные фрагменты sFLT-1 можно использовать вместо полноразмерного белка. Более конкретно, связывающий VEGF домен (домен 2), или альтернативно, домен 2 sFLT-1 плюс домен 3 из sFLT1, KDR или другого члена семейства, можно использовать для связывания и инактивации VEGF. Такие функциональные фрагменты описаны в Wiesmann et al., 1997; Cell, 91: 695-704, полное содержание которого приведено в настоящем описании в качестве ссылки.

[0115] В некоторых вариантах осуществления, белок sFlt-1 представляет собой природный белок sFlt-1, как описано в Патенте США No. 5861484 и последовательности, описанной в SEQ ID NO: 109 в US2013/0323302. Иллюстративная аминокислотная последовательность sFlt-1 описана в настоящем описании как SEQ ID NO: 13. Она также включает, без ограничения, его функциональные фрагменты, включая последовательности домена 2 sFlt-1 или последовательности, указанные в SEQ ID NO: 121 из Публикации патентной заявки США No. 2013/0323302, так же как родственные конструкции, такие как связывающие VEGF слитые белки описанные в Патенте США No. 7635474. Иллюстративный функциональный фрагмент sFlt-1 описан в настоящем описании как SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления, белок sFLT-1 является по меньшей мере приблизительно на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,9%, 99,99% или 100% гомологичным SEQ ID NO: 13 или SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления, белок sFLT-1 имеет по меньшей приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,9%, 99,99% или 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 13 или SEQ ID NO: 14. Белок против VEGF может также включать любые из белков sFLT-1, их вариантов или фрагментов, описанных в Публикации патентной заявки США No. 2013/0323302.

[0116] В некоторых вариантах осуществления, белок sFLT-1 является по меньшей мере приблизительно на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,99%, 99,99% или 100% гомологичным белковой последовательности природного sFLT-1 человека. В некоторых вариантах осуществления, белок sFLT-1 является, самое большее, приблизительно на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,9%, 99,99% или 100% гомологичным белковой последовательности природного sFLT-1 человека. В некоторых вариантах осуществления, белок sFLT-1 имеет по меньшей мере

приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,9%, 99,99% или 100% идентичность последовательности с белковой последовательностью природного sFLT-1 человека. В некоторых вариантах осуществления, белок sFLT-1 имеет самое большее, приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,9%, 99,99% или 100% идентичность последовательности с белковой последовательностью природного sFLT-1 человека. В некоторых вариантах осуществления, белок sFLT-1 является по меньшей мере приблизительно на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,99% или 100% пространственно гомологичным природной конформации белка sFLT-1 человека. В некоторых случаях, белок sFLT-1 является, самое большее, приблизительно на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,99%, 99,99% или 100% пространственно гомологичным природной конформации белка sFLT-1 человека.

[0117] В некоторых вариантах осуществления, белок против VEGF представляет собой антитело против VEGF. В некоторых вариантах осуществления, белок против VEGF представляет собой ранибизумаб (коммерчески доступный под торговым наименованием люцентис® (Genentech, San Francisco, CA), см. на фигуре 1 из Патента США No. 7060269 последовательности вариабельной области тяжелой цепи и легкой цепи ранибизумаба); бевацизумаб (коммерчески доступный под торговым наименованием авастин® (Genentech, San Francisco, CA), см. на фигуре 1 из Патента США No. 6054297 последовательности вариабельной области тяжелой цепи и легкой цепи бевацизумаба); афлиберцепт (коммерчески доступный под торговым наименованием эйлеа® (Regeneron, Tarrytown, NY)); или бролуцизумаб, см. Патент США No. 10035850. В конкретных вариантах осуществления, бевацизумаб включает следующие последовательности вариабельного тяжелой легкой соответственно: домена И цепи, EVOLVESGGGLVOPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVROAPGKGLEWVGWINTYTGE PTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGSSHWYFDVWG **OGTL** (SEQ ID NO: 8); И DIOMTOSPSSLSASVGDRVTITCSASODISNYLNWYOOKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKRTV (SEQ ID NO: 9). В конкретных вариантах осуществления, ранибизумаб включает следующие последовательности вариабельного домена тяжелой и легкой цепи, соответственно: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINTYTGE PTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPYYYGTSHWYFDVWG **QGTL** (SEQ ID NO: 10); DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKRTV (SEQ ID NO: 11). В конкретных вариантах осуществления, афлиберцепт включает аминокислотную последовательность: MVSYWDTGVLLCALLSCLLLTGSSSGSDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSP NITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHR

QTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRDLK TQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKDKTHTCPPCP APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ NO:12). вариантах осуществления, афлиберцепт конкретных включает следующую аминокислотную последовательность: EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASEIIHSWLAWYQQKPGKAPKLLIYLASTLASGVPSR FSGSGSGAEFTLTISSLQPDDFATYYCQNVYLASTNGANFGQGTKLTVLGGGGGSGGGG SGGGGGGGEVOLVESGGGLVOPGGSLRLSCTASGFSLTDYYYMTWVROAPGKGLE WVGFIDPDDDPYYATWAKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAGGDHNSG WGLDIWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 15).

[0118] Эти последовательности можно экспрессировать с ДНК, кодирующей такие последовательности, с использованием генетического кода, стандартного способа, известного специалисту в данной области. Как понятно специалисту в данной области, изза вырожденности генетического кода, последовательности белка против VEGF можно легко экспрессировать с множества различных последовательностей ДНК.

[0119] В некоторых случаях, продукт гена (или продукт терапевтического гена) представляет собой сайт-специфическую эндонуклеазу, обеспечивающую сайт-специфический нокдаун функции гена, например, где эндонуклеаза осуществляет нокаут аллеля, ассоциированного с заболеванием сетчатки. Например, когда доминантный аллель кодирует дефектную копию гена, который, когда относится к дикому типу, представляет собой структурный белок сетчатки и/или обеспечивает нормальную функцию сетчатки, сайт-специфическая эндонуклеаза может являться нацеленной на дефектный аллель и осуществлять нокаут дефектного аллеля.

[0120] В дополнение к нокауту дефектного аллеля, сайт-специфическую нуклеазу можно также использовать для стимуляции гомологичной рекомбинации с донорной ДНК, кодирующий функциональную копию белка, кодируемого дефектным аллелем. Таким образом, например, вирусный вектор как можно использовать для доставки сайтспецифической эндонуклеазы, которая осуществляет нокаут дефектного аллеля, так и можно использовать для доставки функциональной копии дефектного аллеля, что приводит к репарации дефектного аллеля, таким образом, обеспечивая продукцию функционального белка (например, функционального сетчатки ретиношизина, функционального RPE65, функционального периферина и т.д.). См., например, Li et al. (2011) Nature 475:217. В некоторых вариантах осуществления, вирусный вектор содержит гетерологичную нуклеотидную последовательность, кодирующую сайт-специфическую эндонуклеазу; и гетерологичную нуклеотидную последовательность, кодирующую функциональную копию дефектного аллеля, где функциональная копия кодирует функциональный белок сетчатки. Функциональные белки сетчатки включают, например,

ретиношизин, RPE65, белок-1, взаимодействующий с регулятором ГТФазы при пигментном ретините (RGPR), периферин, периферин-2 и т.п.

[0121] Сайт-специфические эндонуклеазы, которые являются пригодными для использования, включают, например, нуклеазы с цинковыми пальцами (ZFN); и подобные активаторам транскрипции эффекторные нуклеазы (TALEN), где такие сайт-специфические эндонуклеазы являются неприродными и модифицированы для нацеливания на специфический ген. Такие сайт-специфические нуклеазы можно конструировать для разрезания в специфических локализациях в геноме, и соединение негомологичных концов может затем осуществлять репарацию разрыва, с вставкой или делецией в то же время нескольких нуклеотидов. Такие вставки или делеции (также обозначенные как «ИНДЕЛЫ») затем сдвигают белок из рамки считывания и эффективно осуществляют нокаут гена. См., например, Публикацию патента США No. 2011/0301073.

[0122] В некоторых вариантах осуществления, последовательность, кодирующая продукт гена, является функционально связанной с промотором. В некоторых вариантах осуществления, последовательность, кодирующая продукт гена, является функционально связанной с конститутивным промотором. В других вариантах осуществления, нуклеотидная последовательность, кодирующая представляющий интерес продукт гена, является функционально связанной с индуцируемым промотором. В некоторых случаях, последовательность, кодирующая продукт гена, является функционально связанной с тканеспецифическим или специфическим для типа клеток регуляторным элементом. Например, в некоторых случаях, последовательность, кодирующая продукт гена, является функционально связанной с специфическим для фоторецепторов регуляторным элементом (например, специфическим для фоторецепторов промотором), например, регуляторным элементом, обеспечивающим избирательную экспрессию функционально гена фоторецепторной клетке. Пригодные специфические связанного фоторецепторов регуляторные элементы включают, например, промотор родопсина; промотор родопсинкиназы (Young et al. (2003) Ophthalmol. Vis. Sci. 44:4076); промотор гена бета-фосфодиэстеразы (Nicoud et al. (2007) J. Gene Med. 9:1015); промотор гена пигментного ретинита (Nicoud et al. (2007) выше); энхансер гена межфоторецепторного ретинол-связывающего белка (IRBP) (Nicoud et al. (2007) выше); промотор гена IRBP (Yokoyama et al. (1992) Exp Eye Res. 55:225).

[0123] В конкретных вариантах осуществления, рекомбинантный вирион AAV является способным связывать гепарин и/или гепарансульфат-протеогликаны (HSPG), например, с аффинностью, по меньшей мере 2-кратной, по меньшей мере 3-кратной, по меньшей мере 4-кратной, по меньшей мере 5-кратной, по меньшей мере 10-кратной, по меньшей мере 20-кратной, по меньшей мере 50-кратной или по меньшей мере 100c рекомбинантным вирионом AAV, кратной, сравнению содержащим соответствующий исходный капсидный белок AAV. В конкретных вариантах осуществления, рекомбинантный вирион AAV является способным связывать гепарин и/или гепарансульфат-протеогликаны (HSPG), например, с аффинностью, по меньшей мере 2-кратной, по меньшей мере 3-кратной, по меньшей мере 4-кратной, по меньшей мере 5-кратной, по меньшей мере 10-кратной, по меньшей мере 20-кратной, по меньшей мере 50-кратной или по меньшей мере 100-кратной, по сравнению с вирионом AAV5. В конкретных вариантах осуществления, рекомбинантный вирион AAV является способным связывать гепарин и/или гепарансульфат-протеогликаны (HSPG), например, с аффинностью, по меньшей мере 2-кратной, по меньшей мере 3-кратной, по меньшей мере 4-кратной, по меньшей мере 5-кратной, по меньшей мере 10-кратной, по меньшей мере 20-кратной, по меньшей мере 100-кратной, по сравнению с вирионом AAV2.5T.

[0124] В конкретных вариантах осуществления, рекомбинантный вирион AAV является способным связываться с внутренней пограничной мембраной (ІLM), например, с аффинностью, по меньшей мере 2-кратной, по меньшей мере 3-кратной, по меньшей мере 4-кратной, по меньшей мере 5-кратной, по меньшей мере 10-кратной, по меньшей мере 20-кратной, по меньшей мере 50-кратной или по меньшей мере 100-кратной, по сравнению с рекомбинантным вирионом AAV, содержащим соответствующий исходный капсидный белок ААУ. В конкретных вариантах осуществления, рекомбинантный вирион AAV является способным связываться с внутренней пограничной мембраной (ILM), например, с аффинностью, по меньшей мере 2-кратной, по меньшей мере 3-кратной, по меньшей мере 4-кратной, по меньшей мере 5-кратной, по меньшей мере 10-кратной, по меньшей мере 20-кратной, по меньшей мере 50-кратной или по меньшей мере 100кратной, по сравнению с вирионом AAV5. В конкретных вариантах осуществления, рекомбинантный вирион AAV является способным связываться с внутренней пограничной мембраной (ILM), например, с аффинностью, по меньшей мере 2-кратной, по меньшей мере 3-кратной, по меньшей мере 4-кратной, по меньшей мере 5-кратной, по меньшей мере 10-кратной, по меньшей мере 20-кратной, по меньшей мере 50-кратной или по меньшей мере 100-кратной, по сравнению с вирионом AAV2.5T.

[0125] В конкретных вариантах осуществления, рекомбинантный вирион ААV увеличенную инфекционность для клеток сетчатки по сравнению инфекционностью для клеток сетчатки рекомбинантного вириона AAV, содержащего соответствующий исходный капсидный белок ААV. В конкретных вариантах осуществления, рекомбинантный вирион AAV является способным пересекать ILM. В конкретных вариантах осуществления, рекомбинантный вирион AAV имеет увеличенную инфекционность для клеток сетчатки по сравнению с инфекционностью для клеток сетчатки рекомбинантного вириона AAV, содержащего соответствующий исходный капсидный белок AAV, и является способным пересекать ILM. В конкретных вариантах осуществления, рекомбинантный вирион AAV имеет увеличенную инфекционность для клеток сетчатки, по сравнению с инфекционностью для клеток сетчатки вириона AAV5. В конкретных вариантах осуществления, рекомбинантный вирион AAV имеет увеличенную инфекционность для клеток сетчатки, по сравнению с инфекционностью для клеток сетчатки вириона AAV2.5T. В конкретных вариантах осуществления, рекомбинантный

вирион AAV является способным к трансдукции клеток сетчатки при инъекции в стекловидное тело млекопитающего. В конкретных вариантах осуществления, рекомбинантный вирион AAV является способным пересекать ILM. В конкретных осуществления, рекомбинантный вирион AAV вариантах имеет увеличенную инфекционность для клеток сетчатки при введении посредством инъекции в стекловидное тело, по сравнению с инфекционностью для клеток сетчатки рекомбинантного вириона AAV, содержащего соответствующий исходный капсидный белок AAV, при введении посредством инъекции в стекловидное тело. В конкретных вариантах осуществления, рекомбинантный вирион AAV имеет увеличенную инфекционность для клеток сетчатки при введении посредством инъекции в стекловидное тело, по сравнению с инфекционностью для клеток сетчатки вириона AAV5, при введении посредством инъекции в стекловидное тело. В конкретных вариантах осуществления, рекомбинантный вирион AAV имеет увеличенную инфекционность для клеток сетчатки при введении посредством инъекции в стекловидное тело, по сравнению с инфекционностью для клеток сетчатки вириона AAV2.5T, при введении посредством инъекции в стекловидное тело. В некоторых вариантах осуществления, клетка(клетки) сетчатки представляет собой(представляют собой) одну или более из фоторецепторной клетки (например, палочек; колбочек), ганглионарной клетки сетчатки (RGC), клетки пигментного эпителия сетчатки (RPE), клетки Мюллера, амакриновой клетки, биполярной клетки и горизонтальной клетки. В некоторых вариантах осуществления, клетка сетчатки представляет собой клетку Мюллера, колбочковую клетку, палочковую клетку, биполярную клетку и/или клетку RPE. В некоторых вариантах осуществления, клетка сетчатки представляет собой клетку Мюллера. В некоторых вариантах осуществления, клетка сетчатки представляет собой колбочковую клетку. В некоторых вариантах осуществления, клетка сетчатки представляет собой биполярную клетку. В некоторых вариантах осуществления, клетка сетчатки представляет собой клетку RPE.

[0126] В конкретных вариантах осуществления, рекомбинантный вирион AAV, содержащий вариант капсидного белка AAV, описанный в настоящем описании, является способным к доставке продукта гена (такого как продукт терапевтического гена) в сетчатку при доставке посредством инъекции в стекловидное тело, например, где полученная в результате экспрессия по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 3 раза, по меньшей мере в 4 раза, по меньшей мере в 5 раз, по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 20 раз, по меньшей мере в 50 раз или по меньшей мере в 100 раз больше, по сравнению с соответствующим рекомбинантным вирионом AAV, содержащим соответствующий исходный капсидный белок AAV. В конкретных вариантах осуществления, рекомбинантный вирион AAV, содержащий вариант капсидного белка AAV, описанный в настоящем описании, является способным к доставке продукта гена в сетчатку при доставке посредством инъекции в стекловидное тело, например, где полученная в результате экспрессия по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 3 раза, по меньшей мере в 4 раза, по меньшей мере в 5 раз, по меньшей мере в 10 раз, по меньшей

мере в 20 раз, по меньшей мере в 50 раз или по меньшей мере в 100 раз больше по сравнению с вектором AAV5 и/или AAV2.5T.

[0127] Многочисленные способы известны в данной области для получения рекомбинантных вирионов AAV, включая трансфекцию, получение стабильных линий клеток и системы продукции инфекционных гибридных вирусов, которые включают гибриды аденовирус-AAV, гибриды вирус герпеса-AAV (Conway, JE et al., (1997) J. Virology 71(11):8780-8789) и гибриды бакуловирус-AAV. Все культуры для продукции гAAV для получения частиц гAAV вируса требуют; 1) пригодных клеток-хозяев, 2) пригодной функции вируса-помощника, 3) генов гер и сар AAV; 4) нуклеиновой кислоты (такой как последовательность, кодирующая продукт гена), фланкированной по меньшей мере одной последовательностью ITR AAV (например, превышающей размер генома вектора гAAV); и 5) пригодных сред и компонентов сред для поддержания продукции гAAV. В некоторых вариантах осуществления, пригодная клетка-хозяин представляет собой клетку-хозяина примата. В некоторых вариантах осуществления, пригодная клетка-хозяин представляет собой линию клеток человеческого происхождения, такую как клетки HeLa, A549, 293 или Perc.6.

[0128] В некоторых вариантах осуществления, пригодная функция помощника предоставлена посредством относящегося к дикому типу или мутантного аденовируса (такого как термочувствительный аденовирус), вирус герпеса (HSV), бакуловирус, или плазмидной конструкции, предоставляющей функции помощника. В некоторых вариантах осуществления, функции помощника AAV предоставлены посредством аденовируса или HSV. В некоторых вариантах осуществления, функции помощника AAV предоставлены посредством бакуловируса, и клетка-хозяин представляет собой клетку насекомого (например, клетки Spodoptera frugiperda (Sf9)).

[0129] В некоторых вариантах осуществления, вирион AAV, описанный в настоящем описании, продуцирован в клетке насекомого. В некоторых вариантах осуществления, вирион AAV, описанный в настоящем описании, продуцирован в клетке Spodoptera frugiperda (Sf9). В некоторых вариантах осуществления, вирион AAV, описанный в настоящем описании, продуцирован в линии клеток человеческого происхождения. В некоторых вариантах осуществления, вирион AAV, описанный в настоящем описании, продуцирован в клетке HeLa, A549, 293 или Perc.6. В некоторых вариантах осуществления, вирион AAV, описанный в настоящем описании, продуцирован в клетке HeLa, A549, 293 или Регс.6. В некоторых вариантах осуществления, вирион AAV, описанный в настоящем описании, продуцирован в клетке HEK-293.

[0130] В некоторых вариантах осуществления, ген гер AAV может происходить из любого серотипа AAV. Как правило, но не обязательно, ген гер AAV происходит из того же серотипа, что и ITR генома вектора rAAV, при условии, что белок гер, кодируемый геном гер, может функционировать для репликации и упаковки генома rAAV.

[0131] Пригодные среды, известные в данной области, можно использовать для продукции rAAV векторов. Эти среды включают, без ограничения, среды, изготавливаемые Hyclone Laboratories и JRH, включая модифицированную среду Игла

(МЕМ), модифицированную способом Дульбекко среду Игла (DMEM), изготовленные на заказ составы, такие как описанные в Патенте США No. 6566118, и среду Sf-900 II SFM, как описано в Патенте США No. 6723551, полное содержание каждого из которых приведено в настоящем описании в качестве ссылки, в частности, применительно к изготовленным на заказ составам сред для использования в продукции рекомбинантных AAV векторов.

[0132] Одним из способов получения вирионов гААV является способ тройной трансфекции. Кратко, плазмидой, содержащей ген гер и ген капсида, такой как полинуклеотид, кодирующий вариант капсидного белка ААV, описанный в настоящем описании, вместе с аденовирусной плазмидой-помощником, можно трансфицировать (например, с использованием способа с фосфатом кальция) линию клеток (например, клетки НЕК-293), и вирионы можно собирать и необязательно, очищать. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, вирион rAAV получен посредством тройной трансфекции геномом вектора, нуклеиновой кислотой, кодирующей гер и сар AAV, такой как полинуклеотид, кодирующий вариант капсидного белка, описанный в настоящем описании, и нуклеиновой кислотой, кодирующей функции помощника AAV, клетки-хозяина, где посредством трансфекции нуклеиновыми кислотами клеток-хозяев получают клетку-хозяина, способную продуцировать вирионы rAAV.

[0133] В некоторых вариантах осуществления, вирионы rAAV можно получать способом с использованием линии клеток-продуцентов, таким как иллюстративный способ с использованием линии клеток-продуцентов, описанный в Martin et al., (2013) Human Gene Therapy Methods 24:253-269; U.S. Pub. No. US2004/0224411; и Liu, X.L. et al. (1999) Gene Ther. 6:293-299). Кратко, линию клеток (например, линию клеток HeLa, 293, A549, или Perc.6) можно стабильно трансфицировать с использованием плазмиды, содержащей ген гер, ген капсида, такой как полинуклеотид, кодирующий вариант капсидного белка, описанный в настоящем описании, и генома вектора. Линии клеток можно подвергать скринингу для отбора лидирующего клона для продукции гААУ, который можно затем размножать для продукции в биореакторе и инфицировать вирусомпомощником (например, аденовирусом или HSV) для инициации продукции rAAV. Затем вирионы можно собирать, аденовирус можно инактивировать (например, нагреванием) и/или удалять, и вирионы rAAV можно очищать. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, вирион rAAV продуцирован посредством линии клеток-продуцентов, содержащей одно или более из нуклеиновой кислоты, кодирующей геном гААУ, нуклеиновой кислоты, кодирующей rep AAV, полинуклеотида, кодирующего вариант капсидного белка, описанный в настоящем описании, и нуклеиновой кислоты, кодирующей функции помощника AAV.

[0134] В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновую кислоту, кодирующую ген гер AAV, ген сар AAV и/или геном rAAV, стабильно поддерживают в линии клетокпродуцентов. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновую кислоту, кодирующую ген гер AAV, ген сар AAV и/или геном rAAV, вводят в одной или нескольких плазмидах в

линию клеток для получения линии клеток-продуцентов. В некоторых вариантах осуществления, ген rep AAV, ген сар AAV и геном rAAV вводят в клетку в одной и той же плазмиде. В других вариантах осуществления, rep AAV, сар AAV и геном rAAV вводят в клетку в двух или более различных плазмидах. В некоторых вариантах осуществления, линия клеток, стабильно трансфицированная плазмидой, сохраняет плазмиду в течение множества пассажей линии клеток (например, 5, 10, 20, 30, 40, 50 или более чем 50 пассажей линии клеток). Например, плазмида(плазмиды) могут реплицироваться по мере репликации клетки, или плазмида(плазмиды) могут интегрировать в геном клетки. Идентифицировано последовательностей, множество позволяющих автономную репликацию плазмиды в клетке (например, клетке человека) (см., например, Krysan, P.J. et al. (1989) Mol. Cell Biol. 9:1026-1033). В некоторых вариантах осуществления, плазмида(плазмиды) может содержать селективный маркер (например, устойчивости к антибиотику), позволяющий отбор клеток, сохраняющих плазмиду. Селективные маркеры, общеупотребительные в клетках млекопитающих, включают, без ограничения, бластицидин, G418, гигромицин В, зеоцин, пуромицин и их производные. Способы введения нуклеиновых кислот в клетку известны в данной области и включают, без ограничения, вирусную трансдукцию, катионную трансфекцию (например, с использованием катионного полимера, такого как DEAE-декстран, или катионного липида, такого как липофектамин), трансфекцию с использованием фосфата кальция, микроинъекцию, бомбардировку частицами, электропорацию трансфекцию наночастицами (более подробно см., например, в Kim, T.K. and Eberwine, J.H. (2010) Anal. Bioanal. Chem. 397:3173-3178).

[0135] В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновые кислоты, кодирующие ген гер AAV, ген сар AAV и/или геном rAAV, стабильно интегрируют в геном линии клеток-продуцентов. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновые кислоты, кодирующие ген rep AAV, ген сар AAV и/или геном rAAV, вводят в одной или нескольких плазмидах в линию клеток для получения линии клеток-продуцентов. В некоторых вариантах осуществления, ген rep AAV, ген сар AAV и геном rAAV вводят в клетку в одной и той же плазмиде. В других вариантах осуществления, ген rep AAV, ген сар AAV и геном rAAV вводят в клетку в двух или более различных плазмидах. В некоторых вариантах осуществления, плазмида(плазмиды) могут содержать селективный маркер (например, маркер устойчивости к антибиотику), позволяющий отбор клеток, сохраняющих плазмиду. Известны способы стабильной интеграции нуклеиновых кислот в множество линий клеток-хозяев. Например, повторяющийся отбор посредством использования селективного маркера) можно использовать для отбора клеток, имеющих интегрированную нуклеиновую кислоту, содержащую селективный маркер (и ген сар AAV, ген гер AAV и/или геном rAAV). В других вариантах осуществления, нуклеиновые кислоты можно интегрировать сайт-специфическим образом в линию клеток для получения линии клеток-продуцентов. Несколько систем сайтспецифической рекомбинации известны в данной области, такие как FLP/FRT (см., например, O'Gorman, S. et al. (1991) Science 251:1351-1355), Cre/loxP (см., например, Sauer, B. and Henderson, N. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85:5166-5170) и phi C31-att (см., например, Groth, A.C. et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. 97:5995-6000).

[0136] В некоторых вариантах осуществления, линия клеток-продуцентов происходит из линии клеток примата (например, линии клеток нечеловекообразного примата, такой как линия клеток Vero или FRhL-2). В некоторых вариантах осуществления, линия клеток происходит из линии клеток человека. В некоторых вариантах осуществления, линия клеток-продуцентов происходит из клеток HeLa, 293, PERC.6® A549 (Crucell). Например, стабильного до введения и/или поддержания/интеграции нуклеиновых кислот, кодирующих ген rep AAV, ген сар AAV и/или геном rAAV, в линию клеток для получения линии клеток-продуцентов, линия клеток представляет собой линию клеток HeLa, 293, A549 или PERC.6® (Crucell), или их производное.

[0137] В некоторых вариантах осуществления, линия клеток-продуцентов является адаптированной для роста в суспензии. Как известно, зависимые от заякоривания клетки, как правило, являются неспособными к росту в суспензии без субстрата, такого как бусины микроносителя. Адаптация линии клеток для роста в суспензии может включать, например, выращивание линии клеток в культуре с постоянным перемешиванием с лопастной мешалкой, с использованием культуральной среды, не содержащей ионов кальция и магния, для предотвращения образования сгустков (и необязательно, средства пенообразования), с использованием культурального сосуда, силиконизирующим соединением, и отбор клеток в культуре (а не в больших сгустках или на стенках сосуда) при каждом пассаже. Дополнительное описание см., например, в вопросы В **ATCC** документе ответов на часто задаваемые (доступном www[dot]atcc[dot]org/Global/FAQs/9/1/Adapting%20a%20monolayer%20cell%20line%20to% 20suspension-40[dot]aspx) и процитированных в этом документе ссылках.

[0138] В некоторых аспектах, настоящее изобретение относится к способу получения вириона гААV, как описано в настоящем описании, включающему (а) культивирование клетки-хозяина в таких условиях, что продуцируются вирионы гААV, где клетка-хозяин содержит (i) полинуклеотид, кодирующий вариант капсидного белка ААV, описанный в настоящем описании; (ii) полинуклеотид, кодирующий белок гер; (iii) полинуклеотидную кассету, содержащую последовательность, кодирующую продукт гена, например, продукт терапевтического гена, фланкированный по меньшей мере одним ITR ААV; и (iv) функции помощника ААV; и (b) выделение вириона гААV, продуцированного клеткой-хозяином. В некоторых вариантах осуществления, указанный по меньшей мере один ITR ААV выбран из группы, состоящей из ITR серотипов ААV1, ААV2, ААV3, ААV4, ААV5, ААV6, ААV7, ААV8, ААV9, ААV10, птичьего ААV, бычьего ААV, собачьего ААV, пошадиного ААV, ААV приматов, не относящегося к приматам ААV или овечьего ААV, или т.п. В некоторых вариантах осуществления, способ дополнительно включает очистку вириона гААV.

[0139] Пригодные культуральные среды для продукции rAAV по настоящему изобретению можно дополнять сывороткой или происходящими из сыворотки рекомбинантными белками на уровне 0,5%-20% (об./об. или масс./об.). Альтернативно, как известно в данной области, вирионы rAAV можно продуцировать в бессывороточных условиях, которые могут также быть обозначены как среды без продуктов животного происхождения. Специалисту в данной области может быть известно, что коммерческие или изготовленные на заказ среды, разработанные для поддержки продукции вирионов rAAV, можно также дополнять одним или более компонентами культуры клеток, известными в данной области, включая, без ограничения, глюкозу, витамины, аминокислоты и/или факторы роста, для увеличения титра в культурах для продукции rAAV.

[0140] Культуры для продукции гААV можно выращивать при множестве условий (в широком диапазоне температур, в течение периодов времени различной длины и т.п.), пригодных для конкретной используемой клетки-хозяина. Как известно в данной области, культуры для продукции гААV включают зависимые от прикрепления культуры, которые можно культивировать в пригодных сосудах для зависимых от прикрепления культур, например, таких как вращающиеся бутыли, фильтр с полыми волокнами, микроносители и биореакторы с уплотненным слоем или с псевдоожиженным слоем. культуры для продукции гААV могут также включать адаптированные для суспензии клетки-хозяева, такие как клетки HeLa, 293 и SF-9, которые можно культивировать множеством способов, включая, например, вращающиеся флаконы, биореактор с механическим перемешиванием и одноразовые системы, такие как система пакетов Wave.

V. КОМПОЗИЦИИ

[0141] Настоящее изобретение относится также к композициям, содержащим рекомбинантный вирион AAV, описанный в настоящем описании, содержащий вариант капсидного белка AAV, описанный в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления, композиция представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую рекомбинантный вирион AAV, описанный в настоящем описании, и один или более фармацевтически приемлемых разбавителей, носителей или наполнителей.

[0142] Рекомбинантный вирион AAV можно комбинировать с фармацевтически приемлемыми носителями, разбавителями и реагентами, которые можно использовать для получения состава, который является в общем безопасным, нетоксичным и желательным, и включает наполнители, пригодные для использования для приматов. Такие наполнители могут являться твердыми, жидкими, полутвердыми или, в случае аэрозольной композиции, газообразными. Примеры таких носителей или разбавителей включают, но без ограничения, воду, солевой раствор, раствор Рингера, раствор декстрозы и 5% человеческий сывороточный альбумин. Дополнительные активные соединения можно также включать в составы. Растворы или суспензии, используемые для составов, могут включать стерильный разбавитель, такой как вода для инъекции, солевой раствор, жирные масла, полиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие синтетические

растворители; антибактериальные соединения, такие как бензиловый спирт или метилпарабены; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия; хелатообразующие соединения, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА); буферы, такие как ацетаты, цитраты или фосфаты; детергенты, такие как Tween 20, для предотвращения агрегации; и соединения для доведения тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза. рН можно доводить с использованием кислот или оснований, таких как соляная кислота или гидроксид натрия. В конкретных вариантах осуществления, фармацевтические композиции являются стерильными. Для случаев, в которых клетки глаза предназначены для приведения в контакт in vivo, рекомбинантный вирион AAV можно рассматривать как пригодный для доставки в глаз.

[0143] Фармацевтические композиции могут дополнительно включать стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для немедленного приготовления стерильных пригодных для инъекций растворов или дисперсий. Для внутривенного введения, пригодные носители включают, но без ограничения, физиологический солевой раствор, бактериостатическую воду или фосфатно-солевой буфер (PBS). В некоторых случаях, композиция является стерильной и должна являться текучей до той степени, чтобы существовала возможность простого введения через шприц. В конкретных вариантах осуществления, фармацевтическая композиция является стабильной в условиях изготовления и хранения, и защищена от загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы. Носитель может представлять собой, например, растворитель или диспергирующую среду, содержащую, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль, и т.п.) и их пригодные смеси. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, посредством использования покрытия, такого как лецитин, посредством поддержания необходимого размера частиц в случае дисперсии, и посредством использования поверхностно-активных веществ. Предотвращения действия микроорганизмов можно достигать посредством различных антибактериальных и противогрибковых средств, например, парабенов, хлорбутанола, фенола, аскорбиновой кислоты, тимеросала и т.п. В некоторых вариантах осуществления, фармацевтическая композиция содержит одно или более изотонических средств, например, сахар, полиспирт, такой как маннит или сорбит, и хлорид натрия. В некоторых вариантах осуществления, фармацевтическая композиция содержит средство, замедляющее абсорбцию, например, моностеарат алюминия и желатин.

[0144] Стерильные растворы онжом получать посредством введения рекомбинантного вириона AAV в необходимом количестве в пригодный растворитель с одним или комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, по необходимости, с последующей фильтрацией стерилизацией. Как правило, дисперсии получают посредством введения активного соединения в стерильный носитель, содержащий необходимые базовую диспергирующую среду и ингредиенты, отличные перечисленных выше. В случае стерильных порошков для получения стерильных пригодных для инъекции растворов, способы получения включают, но без ограничения, вакуумную сушку и сушку замораживанием, с использованием которых получают порошок активного ингредиента плюс любой дополнительный желательный ингредиент из его предварительно стерилизованного фильтрацией раствора.

[0145] В некоторых вариантах осуществления, фармацевтическую композицию получают с использованием носителя, который может защищать вирусный вектор против быстрого выведения из организма, такого как состав с контролируемым высвобождением, включая имплантаты и микроинкапсулированные системы для доставки. Можно использовать биоразлагаемые, биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэфиры и полимолочная кислота. Липосомные суспензии (включая липосомы, нацеленные на инфицированные клетки с использованием моноклональных антител против вирусных антигенов) можно также использовать в качестве фармацевтически приемлемых носителей, например, как описано в Патенте США No. 4522811.

[0146] Может обеспечивать преимущество составление пероральных, офтальмологических или парентеральных композиций в единичной дозированной форме для простоты введения и единообразия дозирования. Единичная дозированная форма, в рамках изобретения, может относиться к физически дискретным единицам, пригодным в качестве единичных доз для субъекта, подлежащего лечению; каждая единица содержит предопределенное количество активного соединения, рассчитанное для получения желательного терапевтического эффекта.

[0147] Можно получать любую концентрацию рекомбинантных вирионов AAV, пригодную для эффективной трансдукции клеток млекопитающих. Например, рекомбинантный вирион AAV можно составлять при концентрации приблизительно 10^8 геномов вектора на мл или более, например, приблизительно 5×10^8 геномов вектора на мл; приблизительно 10^9 геномов вектора на мл; приблизительно 5×10^9 геномов вектора на мл; приблизительно 10^{10} геномов вектора на мл; приблизительно 5×10^{10} геномов вектора на мл; приблизительно 10^{11} геномов вектора на мл; приблизительно 5×10^{11} геномов вектора на мл; приблизительно 10^{12} геномов вектора на мл; приблизительно 1.5×10^{13} геномов вектора на мл; приблизительно 1.5×10^{14} геномов вектора на мл; приблизительно 1.5×10^{14} геномов вектора на мл; приблизительно 1.5×10^{14} геномов вектора на мл; или более. В некоторых вариантах осуществления вирусные частицы можно составлять при концентрации не более чем приблизительно 1.5×10^{15} геномов вектора на мл.

[0148] Рекомбинантный вирион AAV можно составлять в любой пригодной единичной дозе, включая, без ограничения, приблизительно 1×10^8 геномов вектора или более, например, приблизительно 1×10^9 , приблизительно 1×10^{10} , приблизительно 1×10^{11} , приблизительно 1×10^{12} , или приблизительно 1×10^{13} геномов вектора или более, или в конкретных случаях, приблизительно 1×10^{14} геномов вектора. В некоторых вариантах

осуществления, рекомбинантный вирион AAV можно составлять в любой пригодной единичной дозе не более чем приблизительно 4×10^{15} геномов вектора. В некоторых случаях, единичная доза составляет самое большее, приблизительно 5×10^{15} геномов вектора, например, приблизительно 1×10^{14} геномов вектора или менее, например, приблизительно 1×10^{13} , приблизительно 1×10^{12} , приблизительно 1×10^{11} , приблизительно 1×10^{10} , или приблизительно 1×10^{10} геномов вектора или менее, или в конкретных случаях приблизительно 1×10^{10} геномов вектора или менее. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантный вирион AAV можно составлять в любой пригодной единичной дозе не менее чем приблизительно 1×10^{10} геномов вектора. В некоторых случаях, единичная доза составляет от приблизительно 1×10^{10} до приблизительно 1×10^{11} геномов вектора. В некоторых случаях, единичная доза составляет от приблизительно 1×10^{10} до приблизительн

[0149] В некоторых случаях, единичную дозу фармацевтической композиции можно измерять с использованием множественности инфекции (MOI). Под MOI понимают соотношение, или кратность, вирусных геномов к клеткам, в которые можно доставлять нуклеиновую кислоту. В некоторых случаях, MOI может составлять приблизительно 1×10^6 . В некоторых случаях, MOI может составлять приблизительно 1×10^5 - приблизительно 1×10^7 . В некоторых случаях, MOI может составлять приблизительно 1×10^4 - приблизительно 1×10^8 . В некоторых случаях, рекомбинантные вирионы по настоящему изобретению присутствуют при по меньшей мере приблизительно любой из 1×10^1 , 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{10} , 1×10^{11} , 1×10^{12} , 1×10^{13} , 1×10^{14} , 1×10^{15} , 1×10^{16} , 1×10^{17} и 1×10^{18} MOI. В некоторых случаях, рекомбинантные вирионы AAV по настоящему изобретению присутствуют при от приблизительно 1×10^8 до приблизительно 3×10^{14} MOI. В некоторых случаях, рекомбинантные вирионы AAV по настоящему изобретению присутствуют при самое большее приблизительно любой из 1×10^1 , 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^6 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{11} , 1×10^{11} , 1×10^{12} , 1×10^{13} , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{11} , 1×10^{11} , 1×10^{12} , 1×10^{13} , 1×10^{14} , 1×10^{15} , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{11} , 1×10^{11} , 1×10^{12} , 1×10^{13} , 1×10^{14} , 1×10^{15} , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{11} , 1×10^{11} , 1×10^{12} , 1×10^{13} , 1×10^{14} , 1×10^{15} , 1×10^{16} , 1×10^{17} и 1×10^{18} MOI.

[0150] В некоторых аспектах, количество фармацевтической композиции содержит от приблизительно 1×10^8 до приблизительно 1×10^{15} рекомбинантных вирионов AAV, от приблизительно 1×10^9 до приблизительно 1×10^{14} рекомбинантных вирионов AAV, от приблизительно 1×10^{10} до приблизительно 1×10^{13} рекомбинантных вирионов AAV или от приблизительно 1×10^{11} до приблизительно 3×10^{12} рекомбинантных вирионов AAV.

[0151] Фармацевтическая композиции может являться заключенной в контейнер, упаковку или диспенсер, например, шприц, например, предварительно заполненный шприц, вместе с инструкциями для введения.

[0152] В некоторых вариантах осуществления, фармацевтическая композиция содержит фармацевтически приемлемую соль. Множество фармацевтически приемлемых

солей известны в данной области и описаны, например, в «Remington's Pharmaceutical Sciences», 17th edition, Alfonso R. Gennaro (Ed.), Mark Publishing Company, Easton, PA, USA, 1985 (и их более недавних изданиях), в «Encyclopaedia of Pharmaceutical Technology», 3rd edition, James Swarbrick (Ed.), Informa Healthcare USA (Inc.), NY, USA, 2007, и в J. Pharm. Sci. 66: 2 (1977). Также, обзор пригодных солей см. в Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use by Stahl and Wermuth (Wiley-VCH, 2002).

[0153] Фармацевтически приемлемые основно-аддитивные соли представляют собой соли, образованные с использованием металлов или аминов, таких как щелочные и щелочноземельные металлы или органические амины. Металлы, используемые в качестве катионов, содержат натрий, калий, магний, кальций и т.п. Амины содержат N-N'дибензилэтилендиамин, хлорпрокаин, холин, диэтаноламин, дициклогексиламин, этилендиамин, N-метилглюкамин и прокаин (см., например, Berge et al., «Pharmaceutical Salts», J. Pharma Sci., 1977, 66, 119). Основно-аддитивные соли указанных кислых соединений получают посредством приведения в контакт формы свободной кислоты с достаточным количеством желательного основания для получения соли общепринятым образом. Форму свободной кислоты можно регенерировать посредством приведения в контакт формы соли с кислотой и выделения свободной кислоты общепринятым способом. Формы свободной кислоты отличаются от соответствующих им форм соли, некоторым образом, конкретными физическими свойствами, такими как растворимость в полярных растворителях, но в ином отношении соли являются эквивалентными соответствующей им свободной кислоте, для целей настоящего изобретения.

[0154] Фармацевтические композиции можно составлять для введения млекопитающим, таким как приматы, такие как люди. В некоторых вариантах осуществления, фармацевтическая композиция содержит водный носитель, такой как нетоксичные, инертные, фармацевтически приемлемые водные носители. В некоторых вариантах осуществления, рН водного носителя составляет от приблизительно 3 до приблизительно 8. В некоторых вариантах осуществления, рН водного носителя составляет от приблизительно 6 до приблизительно 8.

[0155] В некоторых вариантах осуществления, фармацевтические композиции, представленные в настоящем описании, содержат терапевтически эффективное количество рекомбинантного вириона AAV, описанного в настоящем описании, в смеси с фармацевтически приемлемым носителем и/или наполнителем, например, солевым раствором, фосфатно-солевым буфером, фосфатом и аминокислотами, полимерами, полиолами, сахаром, буферами, консервантами и другими белками. Иллюстративные аминокислоты, полимеры и сахара, И Т.П. представляют собой соединения октилфеноксиполиэтоксиэтанола, соединения моностеарата полиэтиленгликоля, полиоксиэтиленсорбитановые сложные эфиры жирных кислот, сахарозу, фруктозу, декстрозу, мальтозу, глюкозу, маннит, декстран, сорбит, инозитол, галактит, ксилит, лактозу, трегалозу, бычий или человеческий сывороточный альбумин, цитрат, ацетат, растворы Рингера и Хенка, цистеин, аргинин, карнитин, аланин, глицин, лизин, валин,

лейцин, поливинилпирролидон, полиэтилен и гликоль. В некоторых вариантах осуществления, фармацевтическая композиция является стабильной в течение по меньшей мере шести месяцев при приблизительно 4°C.

[0156] В некоторых вариантах осуществления, фармацевтическая композиция, представленная в настоящем описании, содержит буфер, такой как фосфатно-солевой буфер (PBS) или фосфат натрия/сульфат натрия, трис буфер, глициновый буфер, стерильную воду и другие буферы, известные специалисту в данной области, такие как описанные в Good et al. (1966) Biochemistry 5:467.

[0157] Настоящее изобретение относится также к композициям, содержащим рекомбинантный вирион AAV, описанный в настоящем описании, содержащий вариант капсидного белка AAV, описанный в настоящем описании, для использования в способе, описанном в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления, композиция представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую рекомбинантный вирион AAV, описанный в настоящем описании, и один или более фармацевтически приемлемых разбавителей, носителей или наполнителей.

[0158] Настоящее изобретение относится также к композициям, содержащим полинуклеотид, описанный в настоящем описании, кодирующий вариант капсидного белка AAV, описанный в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления, композиция предназначена для использования в способе, описанном в настоящем описании, таком как способ получения рекомбинантного вириона AAV, содержащего вариант капсидного белка AAV.

VI. СПОСОБЫ И ПРИМЕНЕНИЯ

[0159] Как описано в сопутствующих примерах, модифицированные капсидные белки, описанные в настоящем описании, могут придавать усиленный или измененный клеточный тропизм рекомбинантному вириону AAV, содержащему вариант капсидного белка AAV. Например, конкретные варианты капсидных белков AAV, описанные в настоящем описании, являются ассоциированными с увеличенной инфекционностью для сетчатки или увеличенными уровнями экспрессии продукта гена в сетчатке, увеличенным связыванием с ILM, увеличенной инфекционностью для клеток сетчатки после инъекции в стекловидное тело и/или увеличенной экспрессией продукта гена в сетчатке после инъекции в стекловидное тело.

[0160] Примеры компонентов клеток сетчатки, которые можно трансфицировать вирионами, описанными в настоящем описании, могут включать, но без ограничения, астроциты, клетки Мюллера, RGC, аксоны RGC, фоторецепторы, биполярные клетки, амакриновые клетки, горизонтальные клетки и их комбинации. В некоторых случаях, клеточные маркеры используют для измерения трансдукции нуклеиновой кислотой, кодирующей продукт гена, компонента клеток сетчатки. Клеточные маркеры могут включать, но без ограничения, GFAP, виментин, Fox, β-тубулин, родопсин, PKCa, парвальбумин, кальбиндин и их комбинации. В таблице 1 ниже показаны иллюстративные клеточные маркеры и соответствующий компонент клеток сетчатки.

Таблица 1: Обобщение клеточных маркеров и типов клеток

Маркер	Тип клеток
GFAP	Астроциты
Виментин	Клетки Мюллера
Fox	RGC
β-тубулин	Аксоны RGC
Родопсин (Rho)	Палочковые фоторецепторы
PKCa	Биполярные клетки
Парвальбумин	Амакриновые клетки
Кальбиндин	Горизонтальные клетки

[0161] В некоторых случаях, способность вириона гААV к трансдукции продукта гена можно измерять посредством экспрессии репортерного белка. В некоторых вариантах осуществления, репортерный белок может включать GFP, YFP, red cherry, β-галактозидазу или другие репортерные белки, известные в данной области.

[0162] В некоторых случаях, экспрессию репортерного белка с течением времени можно определять посредством получения изображения глаза в различных временных точках. Например, экспрессия GFP может коррелировать с увеличением флуоресценции. Уровень флуоресценции в данной временной точке можно использовать для количественной оценки экспрессии продукта гена.

[0163] В некоторых вариантах осуществления, иммунофлуоресценцию можно использовать для определения локализации трансдуцированного гена в компартменте клетки сетчатки, описанном в настоящем описании. Компартмент клетки сетчатки можно метить с использованием антитела, специфического для клеточного маркера, описанного в настоящем описании. В некоторых случаях, антитело связано с флуорофором. В некоторых случаях, вторичное антитело можно использовать для детекции связывания первичного антитела. Можно получать криосрезы трансдуцированной сетчатки до инкубации с антителом против представляющего интерес клеточного маркера, таким образом, позволяя визуализацию связанного антитела. Криосрез можно затем метить с использованием антитела для детекции трансдукции трансгена, присутствия представляющего интерес клеточного маркера и области перекрывания между ними двумя.

[0164] Соответственно, настоящее изобретение относится к способам усиления или изменения тропизма рекомбинантного вириона AAV, включающим вставку варианта капсидного белка AAV, описанного в настоящем описании, в рекомбинантный вирион AAV. Настоящее изобретение относится также к способам усиления или изменения тропизма рекомбинантного вириона AAV, включающим замену аминокислотных остатков 570-579 исходного капсида AAV на аминокислотную последовательность, содержащую HKFKSGD (SEQ ID NO: 1), для получения варианта капсидного белка AAV, и вставку варианта капсидного белка AAV в рекомбинантный вирион AAV, где нумерация аминокислотных остатков соответствует капсидному белку VP1 AAV5. В некоторых вариантах осуществления, способ включает замену аминокислотных остатков 570-579 на аминокислотную последовательность, содержащую X₁X₂HKFKSGDX₃ (SEQ ID NO: 2),

где X_{1-3} может независимо представлять собой любую аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления, каждый из X_{1-3} независимо выбран из A, L, G, S и T. В некоторых вариантах осуществления, X_1 представляет собой L. В некоторых вариантах осуществления, X_2 представляет собой A. В некоторых вариантах осуществления, способ включает замену аминокислотных остатков 570-579 на аминокислотную последовательность, содержащую LAHKFKSGDA (SEQ ID NO: 3); имеющую по меньшей мере 80% или по меньшей мере 90% гомологию с SEQ ID NO: 3; имеющую по меньшей мере 80% или по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 3; или имеющую четыре или более, пять или более, шесть или более, семь или более, восемь или более, или девять или более последовательных аминокислот в пределах SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления, аминокислотная последовательность содержит LAHKFKSGDA (SEQ ID NO: 3).

[0165] В некоторых вариантах осуществления, исходный капсидный белок AAV представляет собой капсидный белок AAV дикого типа, например, капсидный белок AAV типа 1 (AAV1), AAV типа 2 (AAV2), AAV типа 3 (AAV3), AAV типа 4 (AAV4), AAV типа 5 (AAV5), AAV типа 6 (AAV6), AAV типа 7 (AAV7), AAV типа 8 (AAV8), AAV типа 9 (AAV9), AAV типа 10 (AAV10), птичьего AAV, бычьего AAV, собачьего AAV, лошадиного AAV, AAV приматов, не относящегося к приматам AAV или овечьего AAV. В некоторых вариантах осуществления, исходный капсидный белок AAV представляет собой капсидный белок VP1, VP2 или VP3. В некоторых вариантах осуществления, исходный капсидный белок AAV представляет собой капсидный белок VP1 AAV5.

[0166] В некоторых вариантах осуществления, исходный капсидный белок AAV представляет собой вариант капсидного белка AAV. В некоторых вариантах осуществления, исходный капсидный белок AAV представляет собой вариант капсидного белка AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, птичьего AAV, бычьего AAV, собачьего AAV, лошадиного AAV, AAV приматов, не относящегося к приматам AAV или овечьего AAV. В некоторых вариантах осуществления, исходный капсидный белок AAV представляет собой вариант капсидного белка VP1 AAV5. В некоторых вариантах осуществления, исходный капсидный белок AAV представляет собой вариант капсидного белка VP1 AAV5, имеющий по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% гомологию с SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления, исходный капсидный белок AAV представляет собой вариант капсидного белка VP1 AAV5, имеющий по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления, исходный капсидный белок AAV является гибридным. В некоторых вариантах осуществления, исходный капсидный белок AAV представляет собой гибрид AAV2 и AAV5. В некоторых

вариантах осуществления, исходный капсидный белок AAV представляет собой AAV 2.5Т, или его вариант, имеющий по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% гомологию с капсидным белком AAV2.5T. В некоторых вариантах осуществления, исходный капсидный белок AAV представляет собой AAV 2.5Т, или его вариант, имеющий по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с капсидным белком AAV2.5T. В некоторых вариантах осуществления, исходный капсидный белок AAV представляет собой AAV 2.5T. В некоторых вариантах осуществления, исходный капсидный белок AAV представляет собой капсидный белок VP1, VP2 или VP3. В некоторых вариантах осуществления, исходный капсидный белок AAV представляет собой капсидный белок VP1 AAV2.5T, или его вариант, имеющий по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% гомологию с капсидным белком VP1 AAV2.5T (SEQ ID NO: 5). В некоторых вариантах осуществления, исходный капсидный белок AAV представляет собой капсидный белок VP1 AAV2.5T, или его вариант, имеющий по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с капсидным белком VP1 AAV2.5T (SEQ ID NO: 5).

[0167] Рекомбинантные вирионы ААV, описанные в настоящем описании, содержащие вариант капсидного белка ААУ, описанный в настоящем описании, можно использовать для доставки продукта гена в клетку, например, клетку животного. Например, их можно использовать в исследованиях, например, для определения эффекта, который продукт гена оказывает на жизнеспособность и/или функцию клеток. В качестве другого примера, их можно использовать в медицине, например, для лечения нарушения, например, посредством доставки продукта терапевтического гена в клетку или ткань. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к способам экспрессии продукта гена в клетке, включающим приведение клетки в контакт с композицией, содержащей рекомбинантный вирион AAV, содержащий вариант капсидного белка AAV, описанный в настоящем описании, и полинуклеотидную кассету, содержащую последовательность, кодирующую продукт гена. В некоторых вариантах осуществления, приведение в контакт осуществляют in vitro. В некоторых вариантах осуществления, приведение в контакт осуществляют in vivo, т.е., композицию вводят субъекту. В конкретных вариантах осуществления, композицию вводят парентерально, например, внутривенно, перорально или посредством инъекции. В конкретных вариантах осуществления, композицию вводят в глаз посредством инъекции, например, введения в сетчатку, субретинального введения или введения в стекловидное тело. В конкретных вариантах осуществления, композицию вводят посредством инъекции в сетчатку, субретинальной инъекции или инъекции в стекловидное тело. В конкретных вариантах осуществления, композицию вводят посредством инъекции в стекловидное тело.

[0168] В конкретных вариантах осуществления, в которых клетка млекопитающего подлежит приведению в контакт in vitro с рекомбинантным вирионом AAV, содержащим

вариант капсидного белка AAV, описанный в настоящем описании, клетка может происходить из любого вида млекопитающих, например, грызунов (например, мышей, крыс, песчанок, белок), кроликов, кошек, собак, коз, овец, свиней, лошадей, быков, приматов, человека. Клетка может происходить из разработанной линии клеток, например, клеток WERI, клеток 661W, или клетка может представлять собой первичную клетку.

[0169] В конкретных вариантах осуществления, для стимуляции экспрессии продукта гена, клетку приводят в контакт с рекомбинантным вирионом AAV в течение от приблизительно 30 минут до приблизительно 24 часов или более, например, любого из приблизительно 1 часа, 1,5 часов, 2 часов, 2,5 часов, 3 часов, 3,5 часов, 4 часов, 5 часов, 6 часов, 7 часов, 8 часов, 12 часов, 16 часов, 18 часов, 20 часов или 24 часов и т.д. Клетку можно приводить в контакт с рекомбинантным вирионом AAV один или более раз, например, один раз, два раза, три раза или более чем три раза, и обеспечивают инкубацию клетки с рекомбинантным вирионом AAV в течение некоторого количества времени после каждого события контакта, например, приблизительно 16-24 часов. Приведение клетки в контакт можно осуществлять в любых культуральных средах и в любых условиях культивирования, стимулирующих выживаемость клетки. Например, клетку можно суспендировать в любой пригодной питательной среде, которая является удобной, такой как модифицированная способом Исков DMEM или RPMI 1640, дополненная эмбриональной телячьей сывороткой или инактивированной нагреванием козьей сывороткой (приблизительно 5-10%), L-глутамином, тиолом, В меркаптоэтанолом, и антибиотиками, например, пенициллином и стрептомицином. Культура может содержать факторы роста, на которые клетки являются способными отвечать. Факторы роста, как определено в настоящем описании, представляют собой молекулы, способные стимулировать выживаемость, рост и/или дифференцировку клеток, либо в культуре, либо в интактной ткани, посредством специфических эффектов на трансмембранный рецептор. Факторы роста включают полипептиды и неполипептидные факторы.

[0170] В конкретных вариантах осуществления, эффективное количество рекомбинантного вириона AAV, содержащего вариант капсидного белка AAV, предоставляют для получения экспрессии продукта гена в клетках. В конкретных вариантах осуществления, эффективное количество можно определять эмпирически, например, посредством детекции присутствия или уровней продукта гена, посредством детекции эффекта на жизнеспособность или функцию клеток и т.д. В конкретных вариантах осуществления, эффективное количество рекомбинантного вириона AAV стимулирует равную или большую экспрессию продукта гена в клетке, чем такое же количество эталонного вирусного вектора, такого как рекомбинантный вирион AAV, содержащий исходный капсидный белок AAV. В конкретных вариантах осуществления, экспрессия усилена приблизительно в 2 раза или более, относительно экспрессии с эталонного вирусного вектора; например, приблизительно в любое количество из 3 раз, 4

раз или 5 раз, или более, в некоторых случаях, приблизительно в любое количество из 10 раз, 20 раз или 50 раз, или более, например, 100 раз. В конкретных вариантах осуществления, усиленная экспрессия возникает в конкретном типе клеток, например, в любой из клеток глаза, описанных в настоящем описании.

[0171] Для случаев, в которых клетки приводят в контакт in vivo с композицией, содержащей рекомбинантный вирион AAV, содержащий вариант капсидного белка AAV, описанный в настоящем описании, и полинуклеотидную кассету, содержащую последовательность, кодирующую продукт гена, субъект может представлять собой любое млекопитающее, например, грызунов (например, мышей, крыс, песчанок), кроликов, кошек, собак, коз, овец, свиней, лошадей, быков или приматов (например, человека или нечеловекообразных приматов). Способы и композиции по настоящему описанию находят применение в лечении любого состояния, на которое можно нацеливаться, по меньшей мере частично, посредством генотерапии клеток. Таким образом, композиции и способы по настоящему описанию находят применение в лечении индивидуумов, нуждающихся в клеточной терапии. Клетки включают, но без ограничения, клетки крови, глаза, печени, почки, сердца, мышцы, желудка, кишечника, поджелудочной железы и кожи.

[0172] Настоящее изобретение относится также к способам доставки продукта гена в сетчатку, включающим введение посредством инъекции в стекловидное тело рекомбинантного вириона AAV, содержащего вариант капсидного белка AAV, описанный в настоящем описании, и полинуклеотидную кассету, содержащую последовательность, кодирующую продукт гена. В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к способам доставки продукта гена через ILM, включающим введение посредством инъекции в стекловидное тело рекомбинантного вириона AAV, содержащего вариант капсидного белка AAV, описанный в настоящем описании, и полинуклеотидную кассету, содержащую последовательность, кодирующую продукт гена. В конкретных вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к способу предоставления продукта гена в сетчатке субъекта, включающим введение субъекту посредством инъекции в стекловидное тело фармацевтической композиция, содержащей рекомбинантный вирион AAV, описанный в настоящем описании, где рекомбинантный вирион AAV содержит вариант капсида AAV, представленный или описанный в настоящем описании, и полинуклеотидную последовательность, кодирующую продукт гена.

[0173] В конкретных вариантах осуществления, у субъекта диагностировано, или он, как подозревают, имеет одно или более заболеваний или нарушений, выбранных из группы, состоящей из: острой нейроретинопатии желтого пятна; болезни Бехчета; хориоидальной неоваскуляризации; диабетического увеита; гистоплазмоза; дегенерации желтого пятна, такой как острая дегенерация желтого пятна, неэксудативная возрастная дегенерация желтого пятна и эксудативная возрастная дегенерация желтого пятна; отека, такого как отек желтого пятна, кистоидный отек желтого пятна и диабетический отек

желтого пятна; мультифокального хороидита; травмы глаза, затрагивающей задний сегмент или участок глаза; опухолей глаз; нарушений сетчатки, таких как окклюзия центральной вены сетчатки, диабетическая ретинопатия (включая пролиферативную диабетическую ретинопатию), пролиферативная витреоретинопатия (PVR), окклюзионное поражение артерий сетчатки, отслоение сетчатки, увеальное заболевание сетчатки; симпатической офтальмии; синдрома Фогта-Коянаги-Харада (VKH); увеальной диффузии; состояния, затрагивающего задний сегмент глаза, которое вызывает или на которое влияет лазерная терапия глаза; состояний, затрагивающих задний сегмент глаза, которые вызывает или на которые влияет фотодинамическая терапия; фотокоагуляции, радиационной ретинопатии; нарушений эпиретинальной мембраны; окклюзии ветви вены сетчатки; передней ишемической оптической невропатии; диабетической ишемии сетчатки; ишемической ретинопатии; неретинопатической диабетической дисфункции сетчатки; ретиношизиса; пигментного ретинита; глаукомы; синдрома Ашера, колбочкопалочковой дистрофии; болезни Штаргардта (fundus flavimaculatus); наследственной дегенерации желтого пятна; хориоретинальной дегенерации; врожденного амавроза Лебера; врожденной стационарной ночной слепоты; хороидеремии; синдрома Барде-Бидля; телеангиэктозии желтого пятна; наследственной оптической невропатии Лебера; ретинопатии недоношенных; и нарушений цветного зрения, включая ахроматопсию, протанопию, дейтеронопию и тританопию.

[0174] В конкретных вариантах осуществления, субъект подвержен риску развития одного или более заболеваний или нарушений, выбранных из группы, состоящей из: нейроретинопатии желтого болезни Бехчета; пятна; хориоидальной неоваскуляризации; диабетического увеита; гистоплазмоза; дегенерации желтого пятна, такой как острая дегенерация желтого пятна, неэксудативная возрастная дегенерация желтого пятна и эксудативная возрастная дегенерация желтого пятна; отека, такого как отек желтого пятна, кистоидный отек желтого пятна и диабетический отек желтого пятна; мультифокального хороидита; травмы глаза, затрагивающей задний сегмент или участок глаза; опухолей глаз; нарушений сетчатки, таких как окклюзия центральной вены сетчатки, диабетическая ретинопатия (включая пролиферативную диабетическую ретинопатию), пролиферативная витреоретинопатия (PVR), окклюзионное поражение артерий сетчатки, отслоение сетчатки, увеальное заболевание сетчатки; симпатической офтальмии; синдрома Фогта-Коянаги-Харада (VKH); увеальной диффузии; состояния, затрагивающего задний сегмент глаза, которое вызывает или на которое влияет лазерная терапия глаза; состояний, затрагивающих задний сегмент глаза, которые вызывает или на которые влияет фотодинамическая терапия; фотокоагуляции, радиационной ретинопатии; нарушений эпиретинальной мембраны; окклюзии ветви вены сетчатки; передней ишемической оптической невропатии; диабетической ишемии сетчатки; ишемической ретинопатии; неретинопатической диабетической дисфункции сетчатки; ретиношизиса; пигментного ретинита; глаукомы; синдрома Ашера, колбочко-палочковой дистрофии; болезни Штаргардта (fundus flavimaculatus); наследственной дегенерации желтого пятна;

хориоретинальной дегенерации; врожденного амавроза Лебера; врожденной стационарной ночной слепоты; хороидеремии; синдрома Барде-Бидля; телеангиэктозии желтого пятна; наследственной оптической невропатии Лебера; ретинопатии недоношенных; и нарушений цветного зрения, включая ахроматопсию, протанопию, дейтеронопию и тританопию.

[0175] Настоящее изобретение относится также к способам лечения заболевания или нарушения сетчатки у нуждающегося в этом субъекта, включающим введение посредством инъекции в стекловидное тело рекомбинантного вириона AAV, содержащего вариант капсидного белка AAV, описанный в настоящем описании, и полинуклеотидную кассету, содержащую последовательность, кодирующую продукт терапевтического гена. Настоящее изобретение относится также к способам профилактического лечения заболевания или нарушения сетчатки у нуждающегося в этом субъекта, включающим введение посредством инъекции в стекловидное тело рекомбинантного вириона ААУ, содержащего вариант капсидного белка AAV, описанный в настоящем описании, и полинуклеотидную кассету, содержащую последовательность, кодирующую продукт терапевтического гена. Настоящее изобретение относится также к способам лечения развившегося или диагностированного заболевания или нарушения сетчатки у нуждающегося в этом субъекта, включающим введение посредством инъекции в стекловидное тело рекомбинантного вириона ААV, содержащего вариант капсидного белка AAV, описанный в настоящем описании, и полинуклеотидную кассету, содержащую последовательность, кодирующую продукт терапевтического гена. В некоторых вариантах осуществления, способ включает введение фармацевтической композиции, содержащей рекомбинантный вирион AAV, содержащий вариант капсидного белка AAV, описанный в настоящем описании, и полинуклеотидную кассету, содержащую последовательность, кодирующую продукт терапевтического гена.

[0176] В некоторых вариантах осуществления, заболевание или нарушение выбрано из группы, состоящей из: острой нейроретинопатии желтого пятна; болезни Бехчета; хориоидальной неоваскуляризации; диабетического увеита; гистоплазмоза; дегенерации желтого пятна, такой как острая дегенерация желтого пятна, неэксудативная возрастная дегенерация желтого пятна и эксудативная возрастная дегенерация желтого пятна и диабетический отек желтого пятна; мультифокального хороидита; травмы глаза, затрагивающей задний сегмент или участок глаза; опухолей глаз; нарушений сетчатки, таких как окклюзия центральной вены сетчатки, диабетическая ретинопатия (включая пролиферативную диабетическую ретинопатию), пролиферативная витреоретинопатия (PVR), окклюзионное поражение артерий сетчатки, отслоение сетчатки, увеальное заболевание сетчатки; симпатической офтальмии; синдрома Фогта-Коянаги-Харада (VКН); увеальной диффузии; состояния, затрагивающего задний сегмент глаза, которое вызывает или на которые влияет фотодинамическая

терапия; фотокоагуляции, радиационной ретинопатии; нарушений эпиретинальной мембраны; окклюзии ветви вены сетчатки; передней ишемической оптической невропатии; диабетической сетчатки; ишемии ишемической ретинопатии; неретинопатической диабетической дисфункции сетчатки; ретиношизиса; пигментного ретинита; глаукомы; синдрома Ашера, колбочко-палочковой дистрофии; болезни Штаргардта (fundus flavimaculatus); наследственной дегенерации желтого пятна; хориоретинальной дегенерации; врожденного амавроза Лебера; врожденной стационарной ночной слепоты; хороидеремии; синдрома Барде-Бидля; телеангиэктозии желтого пятна; наследственной оптической невропатии Лебера; ретинопатии недоношенных; нарушений цветного зрения, включая ахроматопсию, протанопию, дейтеронопию и тританопию.

[0177] В конкретных вариантах осуществления, субъект подвержен риску развития одного или более заболеваний или нарушений, выбранных из группы, состоящей из: острой нейроретинопатии желтого болезни Бехчета; хориоидальной пятна; неоваскуляризации; диабетического увеита; гистоплазмоза; дегенерации желтого пятна, такой как острая дегенерация желтого пятна, неэксудативная возрастная дегенерация желтого пятна и эксудативная возрастная дегенерация желтого пятна; отека, такого как отек желтого пятна, кистоидный отек желтого пятна и диабетический отек желтого пятна; мультифокального хороидита; травмы глаза, затрагивающей задний сегмент или участок глаза; опухолей глаз; нарушений сетчатки, таких как окклюзия центральной вены сетчатки, диабетическая ретинопатия (включая пролиферативную диабетическую ретинопатию), пролиферативная витреоретинопатия (PVR), окклюзионное поражение артерий сетчатки, отслоение сетчатки, увеальное заболевание сетчатки; симпатической офтальмии; синдрома Фогта-Коянаги-Харада (VKH); увеальной диффузии; состояния, затрагивающего задний сегмент глаза, которое вызывает или на которое влияет лазерная терапия глаза; состояний, затрагивающих задний сегмент глаза, которые вызывает или на которые влияет фотодинамическая терапия; фотокоагуляции, радиационной ретинопатии; нарушений эпиретинальной мембраны; окклюзии ветви вены сетчатки; передней ишемической оптической невропатии; диабетической ишемии сетчатки; ишемической ретинопатии; неретинопатической диабетической дисфункции сетчатки; ретиношизиса; пигментного ретинита; глаукомы; синдрома Ашера, колбочко-палочковой дистрофии; болезни Штаргардта (fundus flavimaculatus); наследственной дегенерации желтого пятна; хориоретинальной дегенерации; врожденного амавроза Лебера; врожденной стационарной ночной слепоты; хороидеремии; синдрома Барде-Бидля; телеангиэктозии желтого пятна; наследственной оптической невропатии Лебера; ретинопатии недоношенных; нарушений цветного зрения, включая ахроматопсию, протанопию, дейтеронопию и тританопию.

[0178] В конкретных вариантах осуществления, продукт гена ингибирует неоваскуляризацию, например, хориоидальную неоваскуляризацию (CNV), в сетчатке субъекта. Обнаружено, что многие клеточные факторы играют важные роли в регуляции

образования CNV, среди которых могут быть включены, но без ограничения, фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), рецептор VEGF (VEGFR), тромбоцитарный фактор роста (PDGF), индуцируемый гипоксией фактор (HIF), ангиопоэтин (Ang) и другие цитокины, и активируемые митогеном протеинкиназы (MAPK). В некоторых вариантах осуществления, продукт гена представляет собой ингибитор одного или более из VEGF, VEGFR, PDGF, HIF, Ang и MAPK.

[0179] В некоторых вариантах осуществления, продукт гена представляет собой продукт гена или продукт терапевтического гена, описанный в настоящем описании. В собой некоторых вариантах осуществления, продукт гена представляет интерферирующую РНК, аптамер или белок. В некоторых вариантах осуществления, продукт терапевтического гена представляет собой интерферирующую РНК, аптамер или вариантах осуществления, некоторых продукт гена терапевтического гена) представляет собой миРНК, мкРНК или белок. В некоторых продукт гена (или продукт терапевтического гена) вариантах осуществления, представляет собой сайт-специфическую нуклеазу, обеспечивающую сайт-специфический нокдаун функции гена. В некоторых вариантах осуществления, продукт гена (или продукт терапевтического гена) представляет собой интерферирующую РНК. В некоторых вариантах осуществления, продукт гена (или продукт терапевтического гена) представляет собой миРНК или мкРНК.

[0180] В некоторых вариантах осуществления, способ приводит к терапевтическому преимуществу, например, предотвращению развития заболевания или нарушения, остановке прогрессирования заболевания или нарушения, обращению прогрессирования заболевания или нарушения и т.д. В некоторых вариантах осуществления, способ включает стадию детекции того, что достигнуто терапевтическое преимущество.

[0181] В некоторых случаях, экспрессию продукта гена, например, как детектировано посредством измерения уровней продукта гена, посредством измерения терапевтической эффективности и т.д., можно наблюдать через два месяца или менее после введения, например, приблизительно через 4, 3 или 2 недели или менее после введения, например, через 1 неделю после введения рассматриваемой композиции. Ожидают также персистенцию экспрессии продукта гена с течением времени. Соответственно, в некоторых случаях, экспрессию продукта гена, например, как детектировано посредством измерения уровней продукта гена, посредством измерения терапевтической эффективности и т.д., можно наблюдать приблизительно через 2 месяца или более после введения рассматриваемой композиции, например, приблизительно через 4, 6, 8 или 10 месяцев или более, в некоторых случаях приблизительно через 1 год или более, например, через 2, 3, 4 или 5 лет, в конкретных случаях, более чем через 5 лет.

[0182] В конкретных вариантах осуществления, субъекту вводят в один глаз или в каждый из обоих глаз приблизительно 1×10^8 геномов вектора или более, в некоторых случаях, приблизительно любое количество из 1×10^9 , 1×10^{10} , 1×10^{11} , 1×10^{12} или 1×10^{13}

геномов вектора, или более, в конкретных случаях, приблизительно 1×10^{14} геномов вектора или более. В некоторых случаях, количество геномов вектора, которое доставляют, составляет, самое большее, приблизительно 1×10^{15} геномов вектора, например, 1×10^{14} геномов вектора или менее, например, приблизительно любое количество из 1×10^{13} , 1×10^{12} , 1×10^{11} , 1×10^{10} или 1×10^9 геномов вектора, или менее, в конкретных случаях 1×10^8 геномов вектора, и иногда не менее чем 1×10^8 геномов вектора. В некоторых случаях, количество геномов вектора, которое доставляют, составляет от приблизительно 1×10^{10} до приблизительно 1×10^{10} геномов вектора. В некоторых случаях, количество геномов вектора, которое доставляют, составляет от приблизительно 1×10^{10} до приблизительно 1×10^{10} геномов вектора. В некоторых случаях, количество геномов вектора, которое доставляют, составляет от приблизительно 1×10^{10} до приблизительно 1×10^{10} геномов вектора.

[0183] В некоторых случаях, количество фармацевтической композиции, подлежащей введению, можно измерять с использованием множественности инфекции (MOI). В некоторых случаях, MOI может относиться к соотношению, или кратности, вектора или вирусных геномов к клеткам, в которые можно доставлять нуклеиновую кислоту. В некоторых случаях, МОІ может составлять приблизительно 1×10^6 . В некоторых случаях, MOI может составлять приблизительно 1×10^5 - приблизительно 1×10^7 . В некоторых случаях, MOI может составлять приблизительно 1×10⁴ - приблизительно 1×10^{8} . В некоторых случаях, рекомбинантные вирионы AAV по настоящему изобретению присутствуют при по меньшей мере приблизительно любой из 1×10^1 , 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{10} , 1×10^{11} , 1×10^{12} , 1×10^{13} , 1×10^{14} , 1×10^{15} , 1×10^{16} , 1×10^{17} или 1×10^{18} MOI. В некоторых случаях, рекомбинантные вирионы AAV по настоящему изобретению присутствуют при от приблизительно 1×10^8 до приблизительно 3×10^{14} MOI. В некоторых случаях, рекомбинантные вирионы AAV по настоящему изобретению присутствуют при самое большее приблизительно любой из 1×10^1 , 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{10} , 1×10^{11} , 1×10^{12} , 1×10^{13} , 1×10^{14} , 1×10^{15} , 1×10^{16} , 1×10^{17} или 1×10^{18} MOI.

[0184] В некоторых аспектах, количество фармацевтической композиции содержит от приблизительно 1×10^8 до приблизительно 1×10^{15} частиц рекомбинантных вирионов AAV, от приблизительно 1×10^9 до приблизительно 1×10^{14} частиц рекомбинантных вирионов AAV, от приблизительно 1×10^{10} до приблизительно 1×10^{13} частиц рекомбинантных вирионов AAV или от приблизительно 1×10^{11} до приблизительно 3×10^{12} частиц рекомбинантных вирионов AAV.

[0185] В некоторых вариантах осуществления, более чем одно введение (например, два, три, четыре или более введений) можно использовать для достижения желательного уровня экспрессии гена на протяжении периода различных интервалов, например, ежесуточно, еженедельно, ежемесячно, ежегодно и т.д.

[0186] В некоторых аспектах, рекомбинантных вирионов AAV не детектируют в образцах слез, крови, слюны или мочи субъекта-человека через приблизительно 7, приблизительно 14, приблизительно 21 или приблизительно 30 суток после введения указанной фармацевтической композиции. В некоторых аспектах, присутствие или отсутствие рекомбинантного вириона AAV детектируют посредством qПЦР или ELBA.

[0187] В некоторых аспектах, наилучшая корригированная острота зрения (BCVA) субъекта улучшается на приблизительно 1, 2 3, 4, 5 или более строк после способа лечения, описанного в настоящем описании.

[0188] В некоторых аспектах, уменьшение неоваскуляризации оценивают посредством ангиографии с флуоресцеином (FA) после стадии введения.

[0189] В некоторых случаях, толщину сетчатки можно измерять для проверки эффектов лечения. В некоторых случаях, центральная толщина сетчатки субъектачеловека не увеличивается более чем на приблизительно 50 микрон, приблизительно 100 микрон или приблизительно 250 микрон в пределах приблизительно 12 месяцев после лечения с использованием фармацевтической композиции по настоящему изобретению. В некоторых случаях, центральная толщина сетчатки субъекта-человека уменьшается по на приблизительно 50 микрон, приблизительно мере 100 приблизительно 200 микрон, приблизительно 250 микрон, приблизительно 300 микрон, приблизительно 400 микрон, приблизительно 500 микрон или приблизительно 600 микрон в пределах приблизительно 3 месяцев, приблизительно 6 месяцев, приблизительно 9 месяцев или приблизительно 12 месяцев после лечения c использованием фармацевтической композиции по настоящему изобретению. Уменьшение центральной толщины сетчатки субъекта-человека можно измерять, сравнивая центральную толщину сетчатки в одной или нескольких временных точках с исходным измерением, полученным через или в пределах приблизительно 1, 3, 7 или 10 суток введения фармацевтической композиции по настоящему изобретению.

[0190] Из вышеуказанного понятно, что, хотя конкретные варианты осуществления изобретения описаны в настоящем описании для целей иллюстрации, различные модификации можно осуществлять без отклонения от содержания и объема изобретения. Соответственно, изобретение не является ограниченным, за исключением ограничения посредством прилагаемой формулы изобретения.

VII. ИЛЛЮСТРАТИВНЫЕ ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

[0191] Среди представленных вариантов осуществления присутствуют:

- 1. Вирион рекомбинантного аденоассоциированного вируса (AAV), содержащий:
- (а) вариант капсидного белка AAV, содержащий модифицированную последовательность, содержащую одну или более аминокислотных замен в пределах аминокислотных остатков 570-579, относительно исходного капсидного белка AAV, где модифицированная последовательность содержит HKFKSGD (SEQ ID NO: 1), и где нумерация аминокислотных остатков соответствует капсидному белку VP1 AAV5; и

- (b) полинуклеотидную последовательность, кодирующую продукт терапевтического гена.
- 2. Рекомбинантный вирион AAV из варианта осуществления 1, где исходный капсидный белок AAV представляет собой капсидный белок AAV5 или гибридный капсидный белок AAV5 и AAV2.
- 3. Рекомбинантный вирион AAV из варианта осуществления 1 или 2, где исходный капсидный белок AAV представляет собой капсидный белок AAV2.5T.
- 4. Рекомбинантный вирион AAV из любого из вариантов осуществления 1-3, где исходный капсидный белок AAV представляет собой капсидный белок VP1 AAV2.5T.
- 5. Рекомбинантный вирион AAV из любого из вариантов осуществления 1-4, где модифицированная последовательность содержит LAHKFKSGDA (SEQ ID NO: 3).
- 6. Рекомбинантный вирион AAV из любого из вариантов осуществления 1-5, где вариант капсидного белка AAV содержит капсидную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% гомологию с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO:5.
- 7. Рекомбинантный вирион AAV из любого из вариантов осуществления 1-6, где вариант капсидного белка AAV содержит капсидную последовательность, указанную в SEQ ID NO:6 или SEQ ID NO:7.
- 8. Рекомбинантный вирион AAV из любого из вариантов осуществления 1-7, где вирион rAAV представляет собой вариант AAV5 или вариант гибридного вириона AAV2 и AAV5.
- 9. Рекомбинантный вирион AAV из любого из вариантов осуществления 1-8, где вирион rAAV представляет собой вариант вириона AAV2.5T.
- 10. Рекомбинантный вирион AAV из любого из вариантов осуществления 1-9, где рекомбинантный вирион AAV является способным к трансдукции клеток сетчатки при инъекции в стекловидное тело млекопитающего.
- 11. Рекомбинантный вирион AAV из варианта осуществления 10, где рекомбинантный вирион AAV является способным к трансдукции одного или более из: фоторецептора, ганглионарной клетки сетчатки, клетки Мюллера, биполярной клетки, амакриновой клетки, горизонтальной клетки и клетки пигментного эпителия сетчатки при инъекции в стекловидное тело млекопитающего.
- 12. Рекомбинантный вирион AAV из варианта осуществления 10 или 11, где рекомбинантный вирион AAV является способным к трансдукции клеток пигментного эпителия сетчатки при инъекции в стекловидное тело млекопитающего.
- 13. Рекомбинантный вирион AAV из любого из вариантов осуществления 1-12, где продукт терапевтического гена представляет собой миРНК, мкРНК или белок.
- 14. Рекомбинантный вирион AAV из любого из вариантов осуществления 1-13, где продукт терапевтического гена представляет собой продукт гена против фактора роста эндотелия сосудов (против VEGF).

- 15. Рекомбинантный вирион AAV из любого из вариантов осуществления 1-13, где продукт терапевтического гена представляет собой опсин.
- 16. Рекомбинантный вирион AAV из любого из вариантов осуществления 1-15, где полинуклеотид, кодирующий продукт терапевтического гена, фланкирован одним или более ITR AAV.
- 17. Рекомбинантный вирион AAV из варианта осуществления 16, где один или более ITR AAV представляют собой ITR AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, птичьего AAV, бычьего AAV, собачьего AAV, лошадиного AAV, AAV приматов, не относящегося к приматам AAV или овечьего AAV или их варианты.
- 18. Рекомбинантный вирион AAV из варианта осуществления 16 или 17, где один или более ITR AAV представляют собой ITR AAV2 или ITR AAV5.
- 19. Рекомбинантный вирион AAV из любого из вариантов осуществления 1-18, где рекомбинантный вирион AAV имеет измененный клеточный тропизм, по сравнению с AAV2.5T.
- 20. Фармацевтическая композиция, содержащая рекомбинантный вирион AAV из любого из вариантов осуществления 1-19.
 - 21. Способ получения вириона rAAV, включающий:
- (а) культивирование клетки-хозяина в таких условиях, что продуцируются вирионы rAAV, где клетка-хозяин содержит:
- (i) полинуклеотид, кодирующий вариант капсидного белка AAV, содержащий модифицированную последовательность, содержащую одну или более аминокислотных замен в пределах аминокислотных остатков 570-579, относительно исходного капсидного белка AAV, где модифицированная последовательность содержит HKFKSGD (SEQ ID NO: 1);
 - (ii) полинуклеотид, кодирующий белок rep;
- (iii) полинуклеотидную кассету, содержащую последовательность, кодирующую продукт терапевтического гена, фланкированный по меньшей мере одним ITR AAV; и
 - (iv) функции помощника AAV; и
 - (b) выделение вириона rAAV, продуцированного клеткой-хозяином.
- 22. Способ предоставления продукта терапевтического гена в сетчатке субъекта, включающий введение субъекту посредством инъекции в стекловидное тело рекомбинантного вириона AAV из любого из вариантов осуществления 1-19 или фармацевтической композиции из варианта осуществления 20.
- 23. Способ из варианта осуществления 22, где у субъекта диагностировано, или он, как подозревают, имеет одно или более состояний, выбранных из группы, состоящей из: острой нейроретинопатии желтого пятна, болезни Бехчета, хориоидальной неоваскуляризации, диабетического увеита, гистоплазмоза, дегенерации желтого пятна, отека, мультифокального хороидита, травмы глаза, затрагивающей задний сегмент или участок глаза, опухоли глаза, окклюзии центральной вены сетчатки, диабетической

ретинопатии, пролиферативной витреоретинопатии (PVR), окклюзионного поражения артерий сетчатки, отслоения сетчатки, увеального заболевания сетчатки, симпатической офтальмии, синдрома Фогта-Коянаги-Харада (VKH), увеальной диффузии, состояния, затрагивающего задний сегмент глаза, которое вызывает или на которое влияет лазерная терапия глаза, состояний, затрагивающих задний сегмент глаза, которые вызывает или на которые влияет фотодинамическая терапия, фотокоагуляции, радиационной ретинопатии, нарушения эпиретинальной мембраны, окклюзии ветви вены сетчатки, передней ишемической оптической невропатии, диабетической ишемии сетчатки, ишемической ретинопатии, неретинопатической диабетической дисфункции сетчатки, ретиношизиса, пигментного ретинита, глаукомы, синдрома Ашера, колбочко-палочковой дистрофии, болезни Штаргардта, наследственной дегенерации желтого пятна, хориоретинальной дегенерации, врожденного амавроза Лебера, врожденной стационарной ночной слепоты, хороидеремии, синдрома Барде-Бидля, телеангиэктозии желтого пятна, наследственной оптической невропатии Лебера, ретинопатии недоношенных и нарушения цветного зрения.

- 24. Способ лечения заболевания или нарушения сетчатки у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту посредством инъекции в стекловидное тело рекомбинантного вириона AAV из любого из вариантов осуществления 1-19 или фармацевтической композиции из варианта осуществления 20.
- 25. Способ из варианта осуществления 24, где заболевание или нарушение представляет собой острую нейроретинопатию желтого пятна, болезнь Бехчета, хориоидальную неоваскуляризацию, диабетический увеит, гистоплазмоз, дегенерацию желтого пятна, отек, мультифокальный хороидит, травму глаза, затрагивающую задний сегмент или участок глаза, опухоль глаза, окклюзию центральной вены сетчатки, диабетическую ретинопатию, пролиферативную витреоретинопатию (PVR), окклюзионное поражение артерий сетчатки, отслоение сетчатки, увеальное заболевание сетчатки, симпатическую офтальмию, синдром Фогта-Коянаги-Харада (VKH), увеальную диффузию, состояние, затрагивающее задний сегмент глаза, которое вызывает или на которое влияет лазерная терапия глаза, состояния, затрагивающие задний сегмент глаза, которые вызывает или на которые влияет фотодинамическая терапия, фотокоагуляцию, радиационную ретинопатию, нарушения эпиретинальной мембраны, окклюзию ветви вены сетчатки, переднюю ишемическую оптическую невропатию, диабетическую ишемию сетчатки, ишемическую ретинопатию, неретинопатическую диабетическую дисфункцию сетчатки, ретиношизис, пигментный ретинит, глаукому, синдром Ашера, колбочко-палочковую дистрофию, болезнь Штаргардта, наследственную дегенерацию желтого пятна, хориоретинальную дегенерацию, врожденный амавроз Лебера, врожденную стационарную ночную слепоту, хороидеремию, синдром Барде-Бидля, телеангиэктозию желтого пятна, наследственную оптическую невропатию Лебера, ретинопатию недоношенных или нарушение цветного зрения.

- 26. Рекомбинантный вирион AAV из любого из вариантов осуществления 1-19 для использования в способе лечения заболевания или нарушения сетчатки у нуждающегося в этом субъекта, включающем введение фармацевтической композиции, содержащей рекомбинантный вирион AAV, субъекту посредством инъекции в стекловидное тело.
- 27. Рекомбинантный вирион AAV из любого из вариантов осуществления 1-19 для использования в получении лекарственного средства для лечения заболевания или нарушения сетчатки субъекта.
- 28. Рекомбинантный вирион AAV из варианта осуществления 26 или 27, где заболевание или нарушение представляет собой связанную с возрастом дегенерацию желтого пятна (AMD), влажную AMD, сухую AMD, неоваскуляризацию сетчатки, хориоидальную неоваскуляризацию, диабетическую ретинопатию, пролиферативную диабетическую ретинопатию, окклюзию вены сетчатки, окклюзию центральной вены сетчатки, окклюзию ветви вены сетчатки, диабетический отек желтого пятна, диабетическую ишемию сетчатки, ишемическую ретинопатию или диабетический отек сетчатки.
- 29. Вариант капсидного белка AAV, содержащий модифицированную последовательность, содержащую одну или более аминокислотных замен в пределах аминокислотных остатков 570-579, относительно исходного капсидного белка AAV, где модифицированная последовательность содержит HKFKSGD (SEQ ID NO: 1), и где нумерация аминокислотных остатков соответствует капсидному белку VP1 AAV5.
- 30. Вариант капсидного белка AAV из варианта осуществления 29, где исходный капсидный белок AAV представляет собой капсидный белок AAV5 или гибридный капсидный белок AAV5 и AAV2.
- 31. Вариант капсидного белка AAV из варианта осуществления 29 или 30, где исходный капсидный белок AAV представляет собой капсидный белок AAV2.5T.
- 32. Вариант капсидного белка AAV из любого из вариантов осуществления 29-31, где исходный капсидный белок AAV представляет собой капсидный белок VP1 AAV2.5T.
- 33. Вариант капсидного белка AAV из любого из вариантов осуществления 29-32, где модифицированный капсидный белок AAV содержит LAHKFKSGDA (SEQ ID NO: 3) в аминокислотных остатках 570-579, относительно исходного капсидного белка AAV.
- 34. Вариант капсидного белка AAV из любого из вариантов осуществления 29-33, содержащий капсидную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% гомологию с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO:5.
- 35. Вариант капсидного белка AAV из любого из вариантов осуществления 29-34, содержащий капсидную последовательность, указанную в SEQ ID NO:6 или SEQ ID NO:7.
- 36. Нуклеиновая кислота, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую вариант капсидного белка AAV из любого из вариантов осуществлениях 29-35.
- 37. Экспрессирующий вектор, содержащий нуклеиновую кислоту из варианта осуществления 36, где последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая вариант

капсидного белка AAV, является функционально связанной с промоторной последовательностью.

- 38. Экспрессирующий вектор из варианта осуществления 37, дополнительно содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую белок гер.
- 39. Клетка, содержащая экспрессирующий вектор из варианта осуществления 37 или 38.
- 40. Клетка из варианта осуществления 39, дополнительно содержащая нуклеиновую кислоту, кодирующую продукт терапевтического гена.
- 41. Клетка из варианта осуществления 40, где продукт терапевтического гена представляет собой миРНК, мкРНК или белок.
- 42. Клетка из варианта осуществления 40 или 41, где продукт терапевтического гена представляет собой продукт гена против фактора роста эндотелия сосудов (против VEGF).
- 43. Клетка из варианта осуществления 40 или 41, где лекарственное средство представляет собой опсин.
- 44. Клетка из любого из вариантов осуществления 40-43, где полинуклеотид, кодирующий продукт терапевтического гена, фланкирован одним или более ITR AAV.
- 45. Клетка из варианта осуществления 44, где один или более ITR AAV представляют собой ITR AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, птичьего AAV, бычьего AAV, собачьего AAV, лошадиного AAV, AAV приматов, не относящегося к приматам AAV или овечьего AAV, или их варианты.
- 46. Клетка из варианта осуществления 44 или 45, где один или более ITR AAV представляют собой ITR AAV2 или ITR AAV5.

ПРИМЕРЫ

Пример 1: Конструирование библиотек мутантов AAV2.5T

[0192] ААV2.5Т представляет собой гибридный капсид, содержащий области из ААV2 и ААV5, описанный в Патенте США No. 9441244, полное содержание которого приведено в настоящем описании в качестве ссылки. ААV2.5Т является способным к трансдукции сетчатки при субретинальной доставке, но не при инъекции в стекловидное тело. Трансдукция AAV2.5Т может быть блокирована внутренней пограничной мембраной (ILM), обогащенной гепарансульфат-протеогликаном (HSPG).

[0193] Экспонированные на поверхности домены AAV2.5T являются идентичными доменам AAV5, за исключением одиночной замены A на T в ак. 582 AAV2.5T (ак. 581 AAV5), мутации, которая, по-видимому, увеличивает инфекционность в клетках млекопитающих, без влияния на типичное связывание AAV5 с содержащим сиаловую кислоту рецептором. AAV5 и AAV2.5T имеют незначительное связывание гепарансульфата, в то время как AAV2 имеет высокую аффинность для гепарансульфата.

[0194] Для разработки нового варианта AAV с улучшенной способностью пересекать ILM и трансдуцировать клетки сетчатки при доставке посредством инъекции в стекловидное тело, библиотеки мутантных AAV получали из капсида AAV2.5T, с заменой

и вставками в петле в области, аналогичной области связывания HSPG AAV2, как определено посредством выравнивания аминокислот.

[0195] Две мутантные библиотеки получали посредством синтеза фрагментов ДНК для петли из случайных 7 аминокислот. Поскольку существовало 20 возможных аминокислот для каждого из 7 положений аминокислот, теоретическое разнообразие библиотек этих фрагментов составляло приблизительно 1×10^9 уникальных вариантов. Эти мутантные петли были фланкированы аминокислотами LA на 5'-конце и A на 3'-конце.

[0196] С использованием библиотек этих фрагментов, библиотеку вставок петель (LIL) получали посредством вставки петель из 10 аминокислот в положении 577 капсидной последовательности AAV2.5T, в области связывания рецептора.

[0197] Вторую библиотеку получали посредством замены последовательности в экспонированной на поверхности области капсида на вариант последовательности петли между аминокислотами 571 и 580 (нумерация от первой аминокислоты VP1). Эта библиотека названа библиотекой замен петель (LSL).

[0198] Эти варианты капсидов AAV клонировали в плазмиды для получения библиотек индивидуальных упаковывающих вирус клеток (посредством временной трансфекции с использованием интегразы phiC31 в соотношении 1:50 (плазмида:phiC31), как описано в WO2017112868A1). Полученные библиотеки упаковывающих клеток продуцируют мутантные вирионы AAV, состоящие из генома вектора, содержащего мутантный ген Сар, упакованный в капсидные белки, кодируемые этим геномом, с низким уровнем перекрестной упаковки. Чтобы убедиться в разнообразии библиотеки клеток, гДНК выделяли из каждой библиотеки и проводили NGS. Разнообразие составляло приблизительно ~725000 уникальных вариантов в LIL и ~558000 уникальных вариантов в LSL.

Пример 2: Скрининги библиотеки AAV в глазах NHP

[0199] Для исследования способности мутантных капсидов AAV пересекать ILM, библиотеки вариантов вирионов AAV подвергали скринингу in vivo по способности проходить через внутреннюю пограничную мембрану (ILM) и инфицировать клетки сетчатки в глазах нечеловекообразных приматов (NHP).

[0200] Библиотеки мутантных капсидов AAV LIL и LSL инъецировали в стекловидное тело в глаза 3 африканских зеленых мартышек (Chlorocebus sabaeus), каждая в дозах между 6×10^9 и 9×10^9 гв на глаз. Через четыре - шесть недель после инъекции, животных умерщвляли и выделяли эксплантаты ткани сетчатки для каждого животного. Стекловидное тело и сетчатку с хороидальными подлежащими тканями выделяли, и глазное яблоко разрезали вдоль лимба, и переднюю часть глаз отбрасывали. Затем стекловидное тело удаляли, оставляя в то же время сетчатку прикрепленной к глазной чаше. Глазную чашу переносили в CO_2 -независимые среды. Сетчатку и RPE/хороид разрезали для получения фиксированного образца сетчатки. Целый фиксированный образец помещали, фоторецепторным слоем вниз, на поликарбонатную мембрану вставки 10 см чашки Trans-well, содержащей 10 мл CO_2 -независимых сред.

Когда сетчатка укладывалась плоско на вставку, среды удаляли таким образом, чтобы сетчатка подвергалась воздействию атмосферы.

[0201] Сетчатку трансдуцировали вирусом Ad5 человека (разведенным в средах Neurobasal-A без антибиотиков или противогрибковых средств) при множественности инфекции (MOI) 1000 посредством добавления раствора Ad5 поверх ткани на 2 часа. Совместную инфекцию с вирусом Ad5 использовали для увеличения экспрессии PHK Сар из мутантных вирионов AAV, присутствующих в ткани сетчатки, таким образом, увеличения количества PHK мутантных капсидов в инфицированных клетках для последующей детекции.

[0202] После первоначальной инкубации, среду Neurobasal-A+ (добавка В27, 1X GlutaMAX, 1X антибиотик-противогрибковое средство) добавляли на дно лунки таким образом, чтобы она была в контакте с дном вставки, но не покрывала ткань (~10 мл), и эксплантаты ткани инкубировали с СО₂ при 37°С в течение 2 суток. После инкубации, вставку удаляли из чашки, помещали на чистую плоскую поверхность, и осуществляли три вырубки, как показано на ФИГ. 1А. Кратко, 5 мм вырубку нервных волокон сетчатки с RPE/хороидом отбирали из желтого пятна. Вторую концентрическую вырубку затем делали с использованием 10 мм штампа для выделения области сетчатки и RPE/хороида, окружающей желтое пятно, внутри аркад кровеносных сосудов, что было названо парафовеа. Затем собирали оставшуюся периферическую сетчатку и RPE/хороид.

[0203] Затем РНК выделяли из каждой из вырубок ткани и переводили в кДНК посредством RT-ПЦР с последующим одним циклом ПЦР. Полученные продукты ПЦР затем клонировали обратно в плазмиды и секвенировали для определения последовательностей мутантных капсидов AAV, которые являлись способными успешно пересекать ILM и инфицировать клетки сетчатки в глазу обезьяны.

[0204] Для второго и третьего циклов скрининга, варианты LIL и LSL, выделенные из каждой из индивидуальных локализаций (вырубок) сетчатки, смешивали для получения одной библиотеки вариантов для каждой локализации. Эти пулы библиотек затем использовали для получения клеток и библиотек капсидов AAV, которые инъецировали по отдельности в глаза африканской зеленой мартышки (AGM) и собирали с использованием такого же способа вырубки сетчатки, как выше. Кроме того, в одном случае, выделяли пигментный эпителий сетчатки, и варианты выделяли из этой ткани.

[0205] С использованием анализа NGS, идентифицировали AAV2.5T.LSV1. AAV2.5T.LSV1 представляет собой вариант с заменой петли, происходящий из библиотеки LSL, со следующей аминокислотной последовательностью петли: LAHKFKSGDA (SEQ ID NO: 3). AAV2.5T.LSV1 представлял собой 48^{-й} из наиболее распространенных вариантов из области желтого пятна в цикле скрининга 2. В цикле скрининга 3, AAV2.5T.LSV1 представлял собой второй из наиболее распространенных вариантов, обнаруженных в парафовее, и наиболее распространенный вариант, обнаруженный в областях RPE. Относительная распространенность наилучших вариантов в каждом цикле скрининга показана на ФИГ. 1В-1Е.

Пример 3: Продукция AAV2.5T.LSV1 в клетках HEK293

[0206] AAV2.5T.LSV1 получали для дальнейшей характеризации с использованием способа тройной трансфекции в клетках HEK293. Полученные титры AAV2.5T.LSV1 были более 1×10^{13} гв/мл, показывая, что AAV2.5T.LSV1 имел хорошую способность к упаковке.

Пример 4: Аффинность связывания AAV2.5T.LSV1 с гепарином

[0207] Способность AAV2.5T.LSV1 связывать HSPG оценивали посредством проведения анализа связывания гепарина с использованием предварительно набитой колонки GE с гепарином. Связывание гепарина с AAV2.5T.LSV1 сравнивали с AAV2.5T и с двумя другими вариантами, полученными в скринингах, описанных выше. Вектор наносили на колонку, которую затем промывали, и наконец, элюировали с использованием увеличивающихся концентраций NaCl (100 мМ - 1 М). Фракции нанесения, проскока, промывки и элюции собирали и анализировали посредством дотблоттинга с использованием антитела В1.

[0208] Как показано на ФИГ. 2, AAV2.5T не связывается с гепарином. В отличие от этого, AAV2.5T.LSV1 имеет способность связываться с гепарином.

Пример 5: Экспрессия и тропизм в эксплантатах сетчатки свиньи

[0209] Эксплантаты сетчатки свиньи ех vivo поддерживали в лунках trans-well, как описано в PCT/US2017/030636, полное содержание которого приведено в настоящем описании в качестве ссылки, и трансдуцировали с использованием репортерного гена GFP, упакованного в капсид AAV2.5T.LSV1, с использованием 2×10^{10} гв или 4×10^{10} гв. Флуоресцентные изображения в реальном времени получали через одну и две недели после трансдукции. На ФИГ. 3 показано получение изображений в реальном времени эксплантатов сетчатки свиньи. Эти изображения позволяют предполагать, что AAV2.5T.LSV1 является способным к эффективной трансдукции по меньшей мере некоторых клеток свиной сетчатки в культуре.

Пример 6: Экспрессия после введения в стекловидное тело сетчатки нечеловекообразного примата

[0210] Исследования in vivo проводили у африканских зеленых мартышек (Chlorocebus sabaeus), которым инъецировали в стекловидное тело 5×10^{11} гв/глаз AAV2.5T.LSV1, несущего экспрессирующую кассету GFP под контролем универсального промотора. Экспрессию в глазах мониторировали еженедельно посредством флуоресценции глазного дна и визуализации с использованием устройства Heidelberg Spectralis, и она показана на Φ ИГ. 4A-4E. Доставка в стекловидное тело AAV2.5T.LSV1-GFP приводила к экспрессии GFP внутри желтого пятна и аркад кровеносных сосудов. Область аркад кровеносных сосудов сетчатки имеет наиболее толстую ILM, которую считают блокирующей трансдукцию клеток сетчатки большинством AAV при инъекции в стекловидное тело.

Пример 7: Оценка экспрессии после введения в стекловидное тело

[0211] Тропизм AAV2.5T.LSV1 для сетчатки оценивали у нечеловекообразных приматов после IVT инъекции.

[0212] Африканским зеленым мартышкам (Chlorocebus sabaeus) инъецировали в стекловидное тело (IVT) 5×10^{11} гв/глаз AAV2.5T.LSV1, несущего экспрессирующую кассету GFP под контролем универсального промотора, для оценки тропизма AAV2.5T.LSV1.

[0213] Обезьян умерщвляли на сутки 35 после IVT инъекции, и глаза вырезали. Глаза фиксировали в 4% параформальдегиде в течение 24 часов после вырезания, затем подвергали криопротекции с использованием 30% сахарозы/фосфатного буфера Серенсена в течение ночи. Глаза разрезали на квадранты, и сетчатку, включая RPE и хороид, отделяли от склеры. Квадранты сетчатки фиксировали на предметном стекле и накрывали покровным стеклом под 30% сахарозой/фосфатным буфером Серенсена. 5X мозаичные сканы нативного GFP получали с использованием Zeiss Axio.Z1 и соединяли с использованием программного обеспечения Zeiss Zen Blue. Полученные изображения флуоресценции в реальном времени для AAV2.5T.LSV1-GFP показаны на ФИГ. 5A-5D.

[0214] Профили интенсивности GFP получали из 5X сканирований частей фиксированных сетчаток, показанных на ФИГ. 5C-5D. Измерения проводили от края желтого пятна, ближайшего к зрительному нерву, до ресничного тела. Приблизительно 20000 точек измерений, охватывающих длину всего 20 мм, наносили на график на протяжении расстояния от желтого пятна до ресничного тела (ФИГ. 5E).

[0215] Фиксированные образцы сетчатки погружали в фикирующую среду ОСТ и замораживали над изопентаном. Получали криосрезы на протяжении фовеи, средней периферии и периферии толщиной 10 мкм, и предметные стекла окрашивали для иммунофлуоресцентного мечения (IFL). Плоскостные изображения RPE получали посредством отслаивания RPE от хороида в срезе фиксированной сетчатки, и переворачивания среза таким образом, чтобы RPE был помещен верхней стороной вниз на предметное стекло, которое затем окрашивали для IFL. IFL проводили после пермеабилизации 0,1% Triton-х в течение 30 мин, с последующим блокированием сывороточным белком в течение 1 часа с использованием 5% нормальной ослиной сыворотки/6% бычьего сывороточного альбумина в фосфатном буфере Серенсена. IFL проводили с использованием красителей и антител, показанных в таблице 2, в течение ночи при 4°С.

Таблица 2: Красители и антитела

Thomas 20 Apronton in thirm one						
Тип	Первичное	Поставщи	Концент	Вторичное	Поставщи	Концентр
маркера	антитело	к	рация	антитело	к	ация
	или	первичног	первично		вторичног	вторичног
	краситель	о антитела	ГО		о антитела	0
		или	антитела			антитела
		красителя	или			
			красител			
			Я			
Экспресс	GFP	Abcam,	1:1000	Антитело	Jackson	5 мкг/мл

ия продукта гена		кат.# ab13970		осла против антител курицы 488	Immuno Research, кат.# 703- 545-155	
Палочков ые фотореце пторные клетки	Родопсин	Millipore sigma, кат.# MABN15	1:2500	Антитело осла против антител мыши, Alexa Flour 555	Thermo Scientific, кат.# А- 31570	5 мкг/мл
Клетки Мюллера	Глутаминс интетаза	Sigma, кат.# G2781	1:20000	Антитело осла против антител кролика, Alexa Flour 647	Thermo Scientific кат.# А- 31573	5 мкг/мл
Биполярн ые клетки	РКС-альфа	Invitrogen, кат.# MA1- 157	1:50	Антитело осла против антител мыши Alexa Flour 555	Thermo Scientific, кат.# А- 31570	5 мкг/мл
Ганглион арные клеточны е тела сетчатки	Гамма- синуклеин	Abcam, кат.#	1:100	Антитело осла против антител кролика, Alexa Flour 647	Thermo Scientific, кат.# А- 31573	5 мкг/мл
Колбочко вые фотореце пторные клетки	Аррестин колбочек	Millipore Sigma, кат.# AB15282	1:500	Антитело осла против антитела кролика, Alexa Flour 647	Thermo Scientific, кат.# А- 31573	5 мкг/мл
Терминал ьные ветви аксонов ганглиев сетчатки	Антитело против бета III тубулина (Tuj-1)	Abcam, кат.# ab7751	1:500	Антитело осла против антител мыши, Alexa Flour 555	Thermo Scientific, кат.# А- 31570	5 мкг/мл
Пигмент ный эпителий сетчатки (RPE)	RPE-65	Abcam, кат.# ab78036	1:200	Антитело осла против антител мыши, Alexa Flour	Thermo Scientific, кат.# А- 31570	5 мкг/мл

				555	
Ядра	DAPI	Invitrogen, кат.#	5 мкг/мл		
		D21490			

[0216] Срезы тканей визуализировали, и полученные изображения показаны на **ФИГ. 6A-25E**. Обобщение типов клеток, для которых продемонстрирован тропизм вирионы AAV2.5T.LSV1, показан в **таблице 3**.

Таблица 3: Тропизм вирионов

Thomas Princes		
	Фовеа	Сетчатка
Клетки Мюллера	Да	Да
Фоторецепторы	Колбочки	Колбочки >
		палочки
Биполярные клетки	Да	Да
Окончания аксонов во внутреннем сетчатом слое	Биполярные	Биполярные
	клетки	клетки
Пигментный эпителий сетчатки		Да

[0217] Процент положительных по GFP клеток количественно оценивали посредством подсчета вручную клеток с совместной локализацией специфических для клеток маркеров. Количество положительных по GFP биполярных клеток, колбочковых клеток и клеток RPE в различных областях сетчатки показано на ФИГ. 26А-26С, соответственно, и обобщено в таблице 4. Количество положительных по GFP клеток менялось в зависимости от локализации в сетчатке.

Таблица 4: Процент положительных по GFP клеток

Тип клеток (локализация)	% от общего
Колбочки (фовеа)	14-16%
Фоторецепторы (средняя и периферическая сетчатка)	25-55%
Биполярные клетки (средняя и периферическая сетчатка)	25-50%
Клетки RPE (средняя и периферическая сетчатка)	2,5-4%

Пример 8: Определение профиля нейтрализующих антител

[0218] Профили нейтрализующих антител (nAB) определяют для вируса AAV2.5T.LSV1 и AAV2.5T посредством анализа in vitro. Кратко, серийные разведения пулированных антител IgG человека (Gammaguard IVIG) комбинируют с вектором AAV2.5T.LSV1 или AAV2.5T, экспрессирующим GFP, и используют для трансдукции клеток 293T. Экспрессию GFP затем измеряют, и ингибирование экспрессии GFP используют для расчета IC_{50} .

Пример 9: Сравнение профилей нейтрализующих антител для AAV2.5T.LSV1 и AAV2

[0219] Профили нейтрализующих антител (nAB) определяли для вирусов AAV2.5T.LSV1 и AAV2 посредством анализа in vitro. Кратко, серии 3-кратного разведения пулированных антител IgG человека (Gammagard IVIG) получали и комбинировали с векторами AAV2.5T.LSV1 или AAV2, экспрессирующими GFP (AAV2.5T.LSV1-CMV-GFP или AAV2-CMV-GFP, соответственно). Смеси затем использовали для трансдукции клеток 293Т. Клетки инкубировали в течение 3 суток, и

затем измеряли экспрессию GFP. Ингибирование экспрессии GFP использовали для расчета IC_{50} . IC_{50} регистрировали как обратное разведение образца пулированных антител IgG человека, при котором экспрессия GFP уменьшена на 50% (например, IC_{50} 100, показывает что IVIG, разведенное 1:100, уменьшало экспрессию GFP на 50%). Большие значения IC_{50} указывают на увеличенное ингибирование трансдукции AAV антителами, присутствующими в пулированных антителах IgG человека.

[0220] Кривые ингибирования для AAV2.5T.LSV1 и AAV2 показаны на **ФИГ. 27А-27В**. AAV2 имел рассчитанную IC_{50} 103,8, и AAV2.5T.LSV1 имел рассчитанную IC_{50} 9,3. ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

ш	последовательности	<u>а ппотаппа</u>
#	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	АННОТАЦИЯ
		LSV1 Bставка 1
2	1 2	LSV1 Вставка 2
3		LSV1 Вставка 3
4	MSFVDHPPDWLEEVGEGLREFLGLEAGPPKPKPNQQHQDQARGL	VP1 AAV5
	VLPGYNYLGPGNGLDRGEPVNRADEVAREHDISYNEQLEAGDNP	
	YLKYNHADAEFQEKLADDTSFGGNLGKAVFQAKKRVLEPFGLV	
	EEGAKTAPTGKRIDDHFPKRKKARTEEDSKPSTSSDAEAGPSGSQ	
	QLQIPAQPASSLGADTMSAGGGGPLGDNNQGADGVGNASGDWH	
	CDSTWMGDRVVTKSTRTWVLPSYNNHQYREIKSGSVDGSNANA	
	YFGYSTPWGYFDFNRFHSHWSPRDWQRLINNYWGFRPRSLRVKI	
	FNIQVKEVTVQDSTTTIANNLTSTVQVFTDDDYQLPYVVGNGTE	
	GCLPAFPPQVFTLPQYGYATLNRDNTENPTERSSFFCLEYFPSKM	
	LRTGNNFEFTYNFEEVPFHSSFAPSQNLFKLANPLVDQYLYRFVS	
	TNNTGGVQFNKNLAGRYANTYKNWFPGPMGRTQGWNLGSGVN	
	RASVSAFATTNRMELEGASYQVPPQPNGMTNNLQGSNTYALENT	
	MIFNSQPANPGTTATYLEGNMLITSESETQPVNRVAYNVGGQMA	
	TNNQSSTTAPATGTYNLQEIVPGSVWMERDVYLQGPIWAKIPET	
	GAHFHPSPAMGGFGLKHPPPMMLIKNTPVPGNITSFSDVPVSSFIT	
	QYSTGQVTVEMEWELKKENSKRWNPEIQYTNNYNDPQFVDFAP	
	DSTGEYRTTRPIGTRYLTRPL	
5	MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPPKPAERHKDDSR	VP1 AAV2.5T
	GLVLPGYKYLGPFNGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSG	
	DNPYLKYNHADAEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPFG	
	LVEEGAKTAPTGKRIDDHFPKRKKARTEEDSKPSTSSDAEAGPSG	
	SQQLQIPAQPASSLGADTMSAGGGGPLGDNNQGADGVGNASGD	
	WHCDSTWMGDRVVTKSTRTWVLPSYNNHQYREIKSGSVDGSNA	
	NAYFGYSTPWGYFDFNRFHSHWSPRDWQRLINNYWGFRPRSLR	
	VKIFNIQVKEVTVQDSTTTIANNLTSTVQVFTDDDYQLPYVVGNG	
	TEGCLPAFPPQVFTLPQYGYATLNRDNTENPTERSSFFCLEYFPSK	
	MLRTGNNFEFTYNFEEVPFHSSFAPSQNLFKLANPLVDQYLYRFV	
	STNNTGGVQFNKNLAGRYANTYKNWFPGPMGRTQGWNLGSGV	
	NRASVSAFATTNRMELEGASYQVPPQPNGMTNNLQGSNTYALE	
	NTMIFNSQPANPGTTATYLEGNMLITSESETQPVNRVAYNVGGQ	
	MATNNQSSTTAPTTGTYNLQEIVPGSVWMERDVYLQGPIWAKIP	
	ETGAHFHPSPAMGGFGLKHPPPMMLIKNTPVPGNITSFSDVPVSSF	
	ITQYSTGQVTVEMEWELKKENSKRWNPEIQYTNNYNDPQFVDFA	
	PDSTGEYRTTRPIGTRYLTRPL	
6	MSFVDHPPDWLEEVGEGLREFLGLEAGPPKPKPNQQHQDQARGL	
	VLPGYNYLGPGNGLDRGEPVNRADEVAREHDISYNEQLEAGDNP	AAV5.LSV1

	YLKYNHADAEFQEKLADDTSFGGNLGKAVFQAKKRVLEPFGLV	
	EEGAKTAPTGKRIDDHFPKRKKARTEEDSKPSTSSDAEAGPSGSQ	
	QLQIPAQPASSLGADTMSAGGGGPLGDNNQGADGVGNASGDWH	
	CDSTWMGDRVVTKSTRTWVLPSYNNHQYREIKSGSVDGSNANA	
	YFGYSTPWGYFDFNRFHSHWSPRDWQRLINNYWGFRPRSLRVKI	
	FNIQVKEVTVQDSTTTIANNLTSTVQVFTDDDYQLPYVVGNGTE	
	GCLPAFPPQVFTLPQYGYATLNRDNTENPTERSSFFCLEYFPSKM	
	LRTGNNFEFTYNFEEVPFHSSFAPSQNLFKLANPLVDQYLYRFVS	
	TNNTGGVQFNKNLAGRYANTYKNWFPGPMGRTQGWNLGSGVN	
	RASVSAFATTNRMELEGASYQVPPQPNGMTNNLQGSNTYALENT	1
	MIFNSQPANPGTTATYLEGNMLITSESETQPVNRVAYNVGGQML	
	AHKFKSGDAPATGTYNLQEIVPGSVWMERDVYLQGPIWAKIPET	
	GAHFHPSPAMGGFGLKHPPPMMLIKNTPVPGNITSFSDVPVSSFIT	
	QYSTGQVTVEMEWELKKENSKRWNPEIQYTNNYNDPQFVDFAP	
	DSTGEYRTTRPIGTRYLTRPL	
7	MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPPKPAERHKDDSR	VP1
	GLVLPGYKYLGPFNGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSG	AAV2.5T.LSV1
	DNPYLKYNHADAEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPFG	
	LVEEGAKTAPTGKRIDDHFPKRKKARTEEDSKPSTSSDAEAGPSG	
	SQQLQIPAQPASSLGADTMSAGGGGPLGDNNQGADGVGNASGD	
	WHCDSTWMGDRVVTKSTRTWVLPSYNNHQYREIKSGSVDGSNA	
	NAYFGYSTPWGYFDFNRFHSHWSPRDWQRLINNYWGFRPRSLR	
	VKIFNIQVKEVTVQDSTTTIANNLTSTVQVFTDDDYQLPYVVGNG	
	TEGCLPAFPPQVFTLPQYGYATLNRDNTENPTERSSFFCLEYFPSK	
	MLRTGNNFEFTYNFEEVPFHSSFAPSQNLFKLANPLVDQYLYRFV	
	STNNTGGVQFNKNLAGRYANTYKNWFPGPMGRTQGWNLGSGV	
	NRASVSAFATTNRMELEGASYQVPPQPNGMTNNLQGSNTYALE	
	NTMIFNSQPANPGTTATYLEGNMLITSESETQPVNRVAYNVGGQ	
	MLAHKFKSGDAPTTGTYNLQEIVPGSVWMERDVYLQGPIWAKIP	
	ETGAHFHPSPAMGGFGLKHPPPMMLIKNTPVPGNITSFSDVPVSSF	
	ITQYSTGQVTVEMEWELKKENSKRWNPEIQYTNNYNDPQFVDFA	
	PDSTGEYRTTRPIGTRYLTRPL	
8	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGK	Вариабельный
	GLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLR	домен тяжелой
	AEDTAVYYCAKYPHYYGSSHWYFDVWGQGTL	цепи
		бевацизумаба
9	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPK	Вариабельный
	VLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYS	домен легкой
	TVPWTFGQGTKVEIKRTV	цепи
		бевацизумаба
10	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGK	•
	GLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLR	домен тяжелой
	AEDTAVYYCAKYPYYYGTSHWYFDVWGQGTL	цепи
		ранибизумаба
11	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPK	Вариабельный
	VLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYS	домен легкой
	TVPWTFGQGTKVEIKRTV	цепи
		ранибизумаба
12	MVSYWDTGVLLCALLSCLLLTGSSSGSDTGRPFVEMYSEIPEIIH	Афлиберцепт
	MTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIIS	T
	NATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIE	
	LSVGEKLVLNCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRDLKT	
L		

	T	
	QSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVR	
	VHEKDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV	
	VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV	
	LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY	
	TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT	
	PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ	
	KSLSLSPGK	
13	MVSYWDTGVLLCALLSCLLLTGSSSGSKLKDPELSLKGTQHIAG	sFlt-1
	QTLHLQCRGEAAMQHKWSLPEMVSKESERLSITKSACGRNGKQF	
	CSTLTLNTAQANHTGFYSCKYLAVPTSKKKETESAIYIFISDTGRP	
	FVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGK	
	RIIWDSRKGFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNT	
	IIDVQISTPRPVKLLRGHTLVLNCTATTPLNTRVQMTWSYPDEKN	
	KRASVRRRIDQSNSHANIFYSVLTIDKMQNKDKGLYTCRVRSGPS	
	FKSVNTSVHIYDKAFITVKHRKQQVLETVAGKRSYRLSMKVKAF	
	PSPEVVWLKDGLPATEKSARYLTRGYSLIIKDVTEEDAGNYTILLS	
	IKQSNVFKNLTATLIVNVKPQIYEKAVSSFPDPALYPLGSRQ	
14	IYIFISDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKF	Фрагмент sFlt-1
	PLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKT	1
	NYLTHRQTNTI	
15	EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASEIIHSWLAWYQQKPGKAPKL	Бролуцизумаб
	LIYLASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISSLQPDDFATYYCQNVY	
	LASTNGANFGQGTKLTVLGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGSEVQL	
	VESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLTDYYYMTWVRQAPGKGLE	
	WVGFIDPDDDPYYATWAKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDT	
	AVYYCAGGDHNSGWGLDIWGQGTLVTVSS	
16	TAPTGKRIDDHFPKRKKARTEEDSKPSTSSDAEAGPSGSQQLQIPA	VP2
	QPASSLGADTMSAGGGGPLGDNNQGADGVGNASGDWHCDSTW	
	MGDRVVTKSTRTWVLPSYNNHQYREIKSGSVDGSNANAYFGYS	
	TPWGYFDFNRFHSHWSPRDWQRLINNYWGFRPRSLRVKIFNIQV	
	KEVTVQDSTTTIANNLTSTVQVFTDDDYQLPYVVGNGTEGCLPA	
	FPPQVFTLPQYGYATLNRDNTENPTERSSFFCLEYFPSKMLRTGN	
	NFEFTYNFEEVPFHSSFAPSQNLFKLANPLVDQYLYRFVSTNNTG	
	GVQFNKNLAGRYANTYKNWFPGPMGRTQGWNLGSGVNRASVS	
	AFATTNRMELEGASYQVPPQPNGMTNNLQGSNTYALENTMIFNS	
	QPANPGTTATYLEGNMLITSESETQPVNRVAYNVGGQMLAHKFK	
	SGDAPTTGTYNLQEIVPGSVWMERDVYLQGPIWAKIPETGAHFH	
	PSPAMGGFGLKHPPPMMLIKNTPVPGNITSFSDVPVSSFITQYSTG	
	QVTVEMEWELKKENSKRWNPEIQYTNNYNDPQFVDFAPDSTGE	
	YRTTRPIGTRYLTRPL	
17	MSAGGGGPLGDNNQGADGVGNASGDWHCDSTWMGDRVVTKS	VP3
1 /	TRTWVLPSYNNHQYREIKSGSVDGSNANAYFGYSTPWGYFDFNR	
	FHSHWSPRDWQRLINNYWGFRPRSLRVKIFNIQVKEVTVQDSTTT	717 V J.L.S V I
	IANNLTSTVQVFTDDDYQLPYVVGNGTEGCLPAFPPQVFTLPQYG	
	YATLNRDNTENPTERSSFFCLEYFPSKMLRTGNNFEFTYNFEEVPF	
	HSSFAPSQNLFKLANPLVDQYLYRFVSTNNTGGVQFNKNLAGRY	
	ANTYKNWFPGPMGRTQGWNLGSGVNRASVSAFATTNRMELEG	
	ASYQVPPQPNGMTNNLQGSNTYALENTMIFNSQPANPGTTATYL	
	EGNMLITSESETQPVNRVAYNVGGQMLAHKFKSGDAPTTGTYNL	
	QEIVPGSVWMERDVYLQGPIWAKIPETGAHFHPSPAMGGFGLKH	
	PPPMMLIKNTPVPGNITSFSDVPVSSFITQYSTGQVTVEMEWELK	
	KENSKRWNPEIQYTNNYNDPQFVDFAPDSTGEYRTTRPIGTRYLT	

RPL*

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

- 1. Вирион рекомбинантного аденоассоциированного вируса (AAV), содержащий:
- (а) вариант капсидного белка AAV, содержащий модифицированную последовательность, содержащую одну или более аминокислотных замен в пределах аминокислотных остатков 570-579, относительно исходного капсидного белка AAV, где модифицированная последовательность содержит HKFKSGD (SEQ ID NO: 1), и где нумерация аминокислотных остатков соответствует капсидному белку VP1 AAV5; и
- (b) полинуклеотидную последовательность, кодирующую продукт терапевтического гена.
- 2. Рекомбинантный вирион AAV по п.1, где исходный капсидный белок AAV представляет собой капсидный белок AAV5 или гибридный капсидный белок AAV5 и AAV2.
- 3. Рекомбинантный вирион AAV по п.1 или 2, где исходный капсидный белок AAV представляет собой капсидный белок AAV2.5T.
- 4. Рекомбинантный вирион AAV по любому из пп. 1-3, где исходный капсидный белок AAV представляет собой капсидный белок VP1 AAV2.5T.
- 5. Рекомбинантный вирион AAV по любому из пп. 1-4, где модифицированная последовательность содержит LAHKFKSGDA (SEQ ID NO: 3).
- 6. Рекомбинантный вирион AAV по любому из пп. 1-5, где вариант капсидного белка AAV содержит капсидную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% гомологию с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO:5.
- 7. Рекомбинантный вирион AAV по любому из пп. 1-6, где вариант капсидного белка AAV содержит капсидную последовательность, указанную в SEQ ID NO:6 или SEQ ID NO:7.
- 8. Рекомбинантный вирион AAV по любому из пп. 1-7, где вирион rAAV представляет собой вариант AAV5 или вариант гибридного вириона AAV2 и AAV5.
- 9. Рекомбинантный вирион AAV по любому из пп. 1-8, где вирион rAAV представляет собой вариант вириона AAV2.5T.
- 10. Рекомбинантный вирион AAV по любому из пп. 1-9, где рекомбинантный вирион AAV является способным к трансдукции клеток сетчатки при инъекции в стекловидное тело млекопитающего.
- 11. Рекомбинантный вирион AAV по п.10, где рекомбинантный вирион AAV является способным к трансдукции одного или более из: фоторецептора, ганглионарной клетки сетчатки, клетки Мюллера, биполярной клетки, амакриновой клетки, горизонтальной клетки и клетки пигментного эпителия сетчатки при инъекции в стекловидное тело млекопитающего.
- 12. Рекомбинантный вирион AAV по п.10 или 11, где рекомбинантный вирион AAV является способным к трансдукции клеток пигментного эпителия сетчатки при инъекции в стекловидное тело млекопитающего.

- 13. Рекомбинантный вирион AAV по любому из пп. 1-12, где продукт терапевтического гена представляет собой миРНК, мкРНК или белок.
- 14. Рекомбинантный вирион AAV по любому из пп. 1-13, где продукт терапевтического гена представляет собой продукт гена против фактора роста эндотелия сосудов (против VEGF).
- 15. Рекомбинантный вирион AAV по любому из пп. 1-13, где продукт терапевтического гена представляет собой опсин.
- 16. Рекомбинантный вирион AAV по любому из пп. 1-15, где полинуклеотид, кодирующий продукт терапевтического гена, фланкирован одним или более ITR AAV.
- 17. Рекомбинантный вирион AAV по п.16, где один или более ITR AAV представляют собой ITR AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, птичьего AAV, бычьего AAV, собачьего AAV, лошадиного AAV, AAV приматов, не относящегося к приматам AAV или овечьего AAV, или их варианты.
- 18. Рекомбинантный вирион AAV по п.16 или 17, где один или более ITR AAV представляют собой ITR AAV2 или ITR AAV5.
- 19. Рекомбинантный вирион AAV по любому из пп. 1-18, где рекомбинантный вирион AAV имеет измененный клеточный тропизм, по сравнению с AAV2.5T.
- 20. Фармацевтическая композиция, содержащая рекомбинантный вирион AAV по любому из пп. 1-19.
 - 21. Способ получения вириона rAAV, включающий:
- (а) культивирование клетки-хозяина в таких условиях, что продуцируются вирионы rAAV, где клетка-хозяин содержит:
- (i) полинуклеотид, кодирующий вариант капсидного белка AAV, содержащий модифицированную последовательность, содержащую одну или более аминокислотных замен в пределах аминокислотных остатков 570-579, относительно исходного капсидного белка AAV, где модифицированная последовательность содержит HKFKSGD (SEQ ID NO: 1);
 - (ii) полинуклеотид, кодирующий белок rep;
- (iii) полинуклеотидную кассету, содержащую последовательность, кодирующую продукт терапевтического гена, фланкированный по меньшей мере одним ITR AAV; и
 - (iv) функции помощника AAV; и
 - (b) выделение вириона rAAV, продуцированного клеткой-хозяином.
- 22. Способ предоставления продукта терапевтического гена в сетчатке субъекта, включающий введение субъекту посредством инъекции в стекловидное тело рекомбинантного вириона AAV по любому из пп. 1-19 или фармацевтической композиции по п.20.
- 23. Способ по п.22, где у субъекта диагностировано, или он, как подозревают, имеет одно или более состояний, выбранных из группы, состоящей из: острой нейроретинопатии желтого пятна, болезни Бехчета, хориоидальной неоваскуляризации, диабетического увеита, гистоплазмоза, дегенерации желтого пятна, отека,

мультифокального хороидита, травмы глаза, затрагивающей задний сегмент или участок глаза, опухоли глаза, окклюзии центральной вены сетчатки, диабетической ретинопатии, пролиферативной витреоретинопатии (PVR), окклюзионного поражения артерий сетчатки, отслоения сетчатки, увеального заболевания сетчатки, симпатической офтальмии, Фогта-Коянаги-Харада (VKH), vвеальной диффузии, синдрома состояния, затрагивающего задний сегмент глаза, которое вызывает или на которое влияет лазерная терапия глаза, состояний, затрагивающих задний сегмент глаза, которые вызывает или на которые влияет фотодинамическая терапия, фотокоагуляции, радиационной ретинопатии, нарушения эпиретинальной мембраны, окклюзии ветви вены сетчатки, передней ишемической оптической невропатии, диабетической ишемии сетчатки, ишемической ретинопатии, неретинопатической диабетической дисфункции сетчатки, ретиношизиса, пигментного ретинита, глаукомы, синдрома Ашера, колбочко-палочковой дистрофии, болезни Штаргардта, наследственной дегенерации желтого пятна, хориоретинальной дегенерации, врожденного амавроза Лебера, врожденной стационарной ночной слепоты, хороидеремии, синдрома Барде-Бидля, телеангиэктозии желтого пятна, наследственной оптической невропатии Лебера, ретинопатии недоношенных и нарушения цветного зрения.

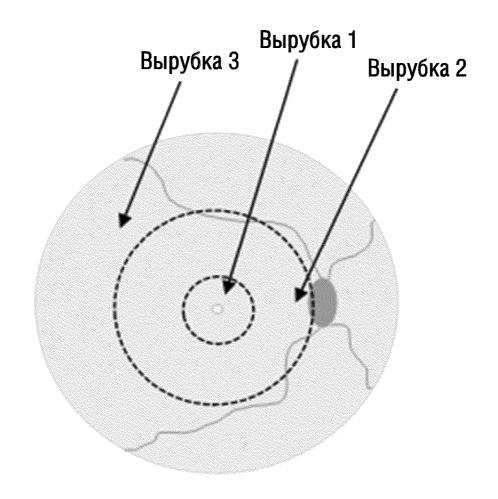
- 24. Способ лечения заболевания или нарушения сетчатки у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту посредством инъекции в стекловидное тело рекомбинантного вириона AAV по любому из пп. 1-19 или фармацевтической композиции по п.20.
- 25. Способ по п.24, где заболевание или нарушение представляет собой острую нейроретинопатию желтого пятна, болезнь Бехчета, хориоидальную неоваскуляризацию, диабетический увеит, гистоплазмоз, дегенерацию желтого пятна, отек, мультифокальный хороидит, травму глаза, затрагивающую задний сегмент или участок глаза, опухоль глаза, окклюзию центральной вены сетчатки, диабетическую ретинопатию, пролиферативную витреоретинопатию (PVR), окклюзионное поражение артерий сетчатки, отслоение сетчатки, увеальное заболевание сетчатки, симпатическую офтальмию, синдром Фогта-Коянаги-Харада (VKH), увеальную диффузию, состояние, затрагивающее задний сегмент глаза, которое вызывает или на которое влияет лазерная терапия глаза, состояния, затрагивающие задний сегмент глаза, которые вызывает или на которые влияет фотодинамическая терапия, фотокоагуляцию, радиационную ретинопатию, нарушения эпиретинальной мембраны, окклюзию ветви вены сетчатки, переднюю ишемическую оптическую невропатию, диабетическую ишемию сетчатки, ишемическую ретинопатию, неретинопатическую диабетическую дисфункцию сетчатки, ретиношизис, пигментный ретинит, глаукому, синдром Ашера, колбочко-палочковую дистрофию, болезнь дегенерацию Штаргардта, наследственную желтого пятна, хориоретинальную дегенерацию, врожденный амавроз Лебера, врожденную стационарную ночную слепоту, хороидеремию, синдром Барде-Бидля, телеангиэктозию желтого пятна, наследственную

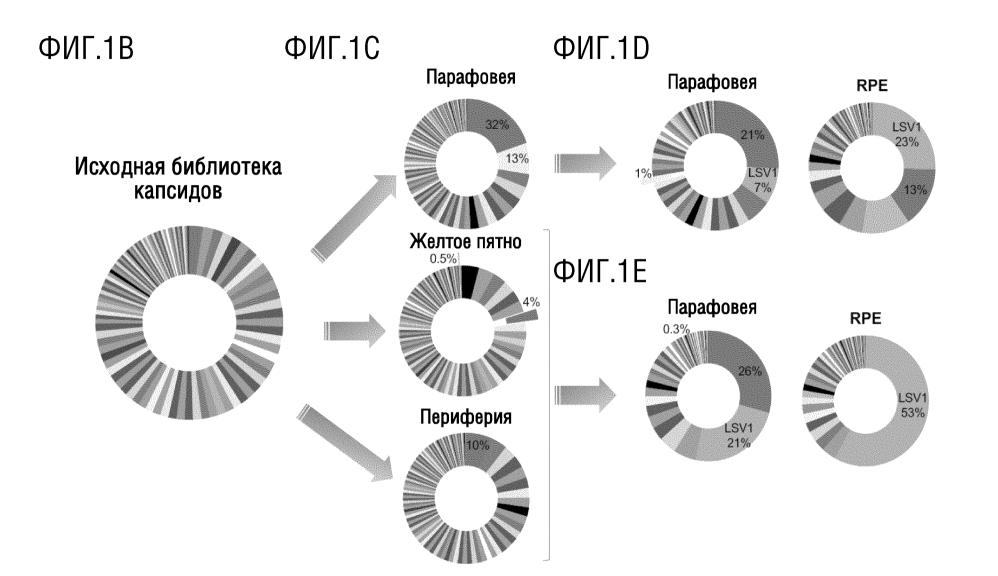
оптическую невропатию Лебера, ретинопатию недоношенных или нарушение цветного зрения.

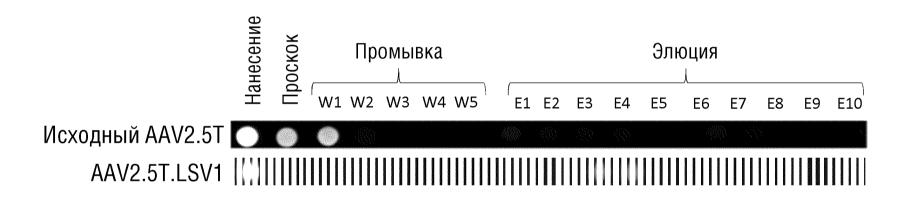
- 26. Рекомбинантный вирион AAV по любому из пп. 1-19 для применения в способе лечения заболевания или нарушения сетчатки у нуждающегося в этом субъекта, включающем введение фармацевтической композиции, содержащей рекомбинантный вирион AAV, субъекту посредством инъекции в стекловидное тело.
- 27. Рекомбинантный вирион AAV по любому из пп. 1-19 для применения в получении лекарственного средства для лечения заболевания или нарушения сетчатки субъекта.
- 28. Рекомбинантный вирион AAV по п.26 или 27, где заболевание или нарушение представляет собой связанную с возрастом дегенерацию желтого пятна (AMD), влажную AMD, сухую AMD, неоваскуляризацию сетчатки, хориоидальную неоваскуляризацию, диабетическую ретинопатию, пролиферативную диабетическую ретинопатию, окклюзию вены сетчатки, окклюзию ветви вены сетчатки, диабетический отек желтого пятна, диабетической ишемии сетчатки, ишемическую ретинопатию, или диабетический отек сетчатки.
- 29. Вариант капсидного белка AAV, содержащий модифицированную последовательность, содержащую одну или более аминокислотных замен в пределах аминокислотных остатков 570-579, относительно исходного капсидного белка AAV, где модифицированная последовательность содержит HKFKSGD (SEQ ID NO: 1), и где нумерация аминокислотных остатков соответствует капсидному белку VP1 AAV5.
- 30. Вариант капсидного белка AAV по п.29, где исходный капсидный белок AAV представляет собой капсидный белок AAV5 или гибридный капсидный белок AAV5 и AAV2.
- 31. Вариант капсидного белка AAV по п.29 или 30, где исходный капсидный белок AAV представляет собой капсидный белок AAV2.5T.
- 32. Вариант капсидного белка AAV по любому из пп. 29-31, где исходный капсидный белок AAV представляет собой капсидный белок VP1 AAV2.5T.
- 33. Вариант капсидного белка AAV по любому из пп. 29-32, где модифицированный капсидный белок AAV содержит LAHKFKSGDA (SEQ ID NO: 3) в аминокислотных остатках 570-579, относительно исходного капсидного белка AAV.
- 34. Вариант капсидного белка AAV по любому из пп. 29-33, содержащий капсидную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% гомологию с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO:5.
- 35. Вариант капсидного белка AAV по любому из пп. 29-34, содержащий капсидную последовательность, указанную в SEQ ID NO:6 или SEQ ID NO:7.
- 36. Нуклеиновая кислота, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую вариант капсидного белка AAV по любому из пп. 29-35.

- 37. Экспрессирующий вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п.36, где последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая вариант капсидного белка AAV является функционально связанной с промоторной последовательностью.
- 38. Экспрессирующий вектор по п.37, дополнительно содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую белок гер.
 - 39. Клетка, содержащая экспрессирующий вектор по п.37 или 38.
- 40. Клетка по п.39, дополнительно содержащая нуклеиновую кислоту, кодирующую продукт терапевтического гена.
- 41. Клетка по п.40, где продукт терапевтического гена представляет собой миРНК, мкРНК или белок.
- 42. Клетка по п.40 или 41, где продукт терапевтического гена представляет собой продукт гена против фактора роста эндотелия сосудов (против VEGF).
 - 43. Клетка по п.40 или 41, где лекарственное средство представляет собой опсин.
- 44. Клетка по любому из пп. 40-43, где полинуклеотид, кодирующий продукт терапевтического гена, фланкирован одним или более ITR AAV.
- 45. Клетка по п.44, где один или более ITR AAV представляют собой ITR AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, птичьего AAV, бычьего AAV, собачьего AAV, лошадиного AAV, AAV приматов, не относящегося к приматам AAV или овечьего AAV, или их варианты.
- 46. Клетка по п.44 или 45, где один или более ITR AAV представляют собой ITR AAV2 или ITR AAV5.

ФИГ.1А

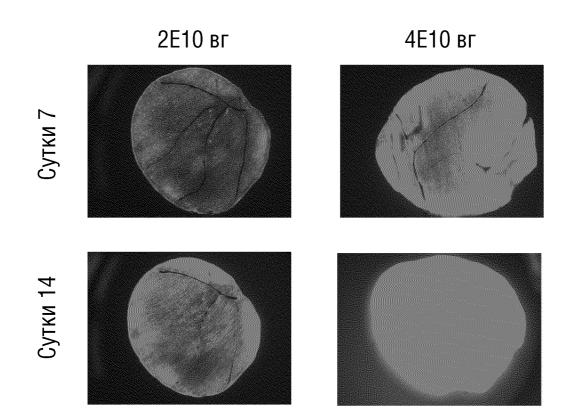






3/32

ФИГ.3



ФИГ.4А

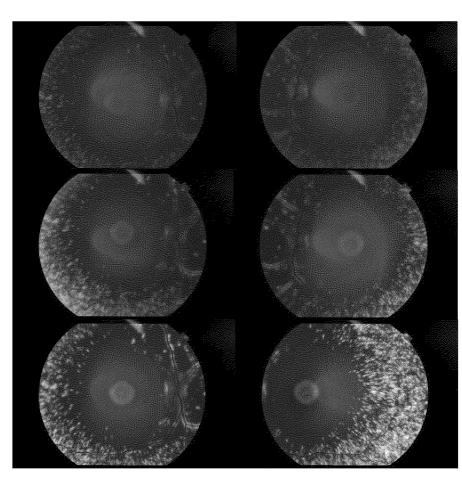
ФИГ.4С

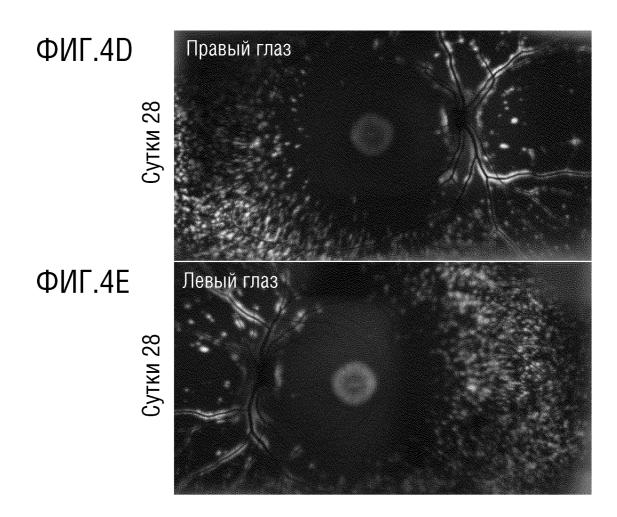
Сутки 14

ФИГ.4В

Сутки 21

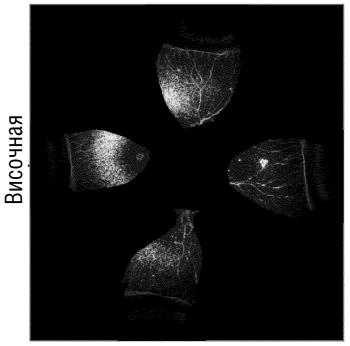
Сутки 28





ФИГ.5А

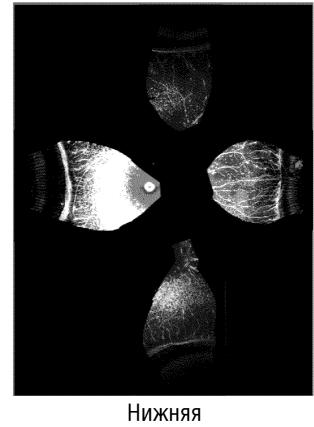
Верхняя



Нижняя Верхняя

ФИГ.5В

Височная

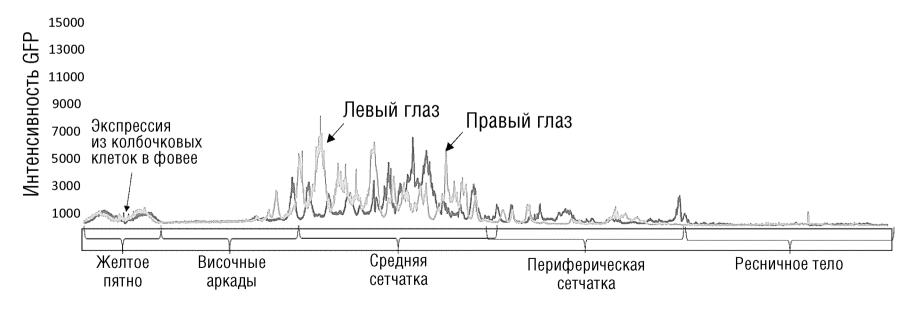


Носовая

Носовая



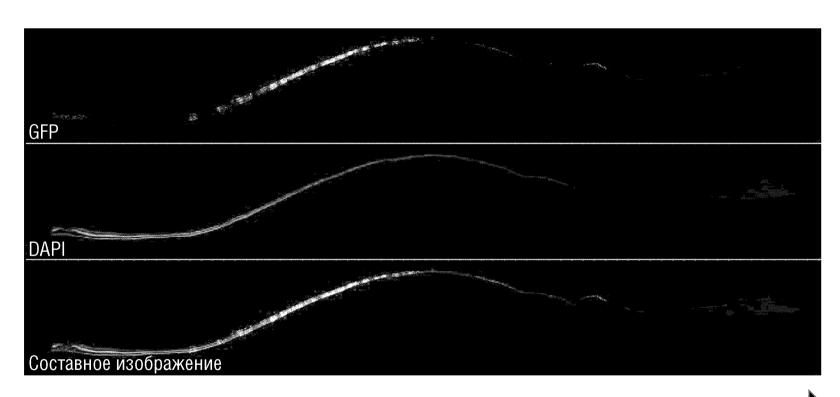






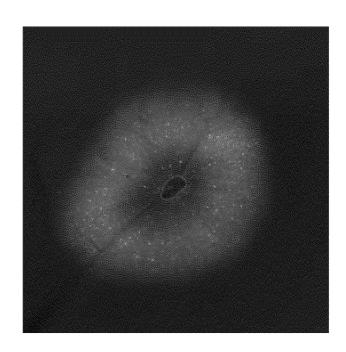


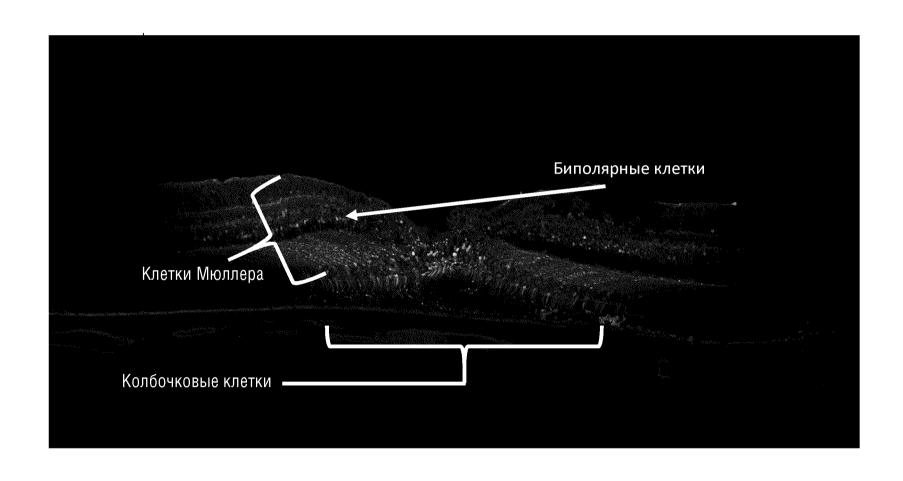
ФИГ.6С



Фовея Периферия

ФИГ.7

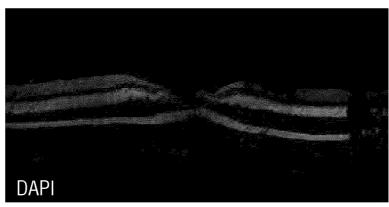




ФИГ.9А



ФИГ.9В



ФИГ.9С



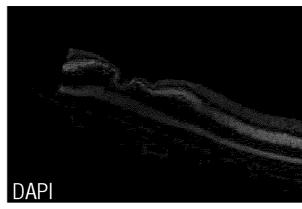
ФИГ.9D



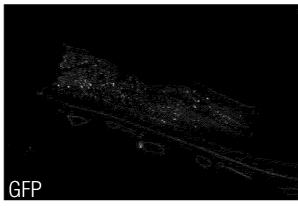
ФИГ.10А



ФИГ.10В



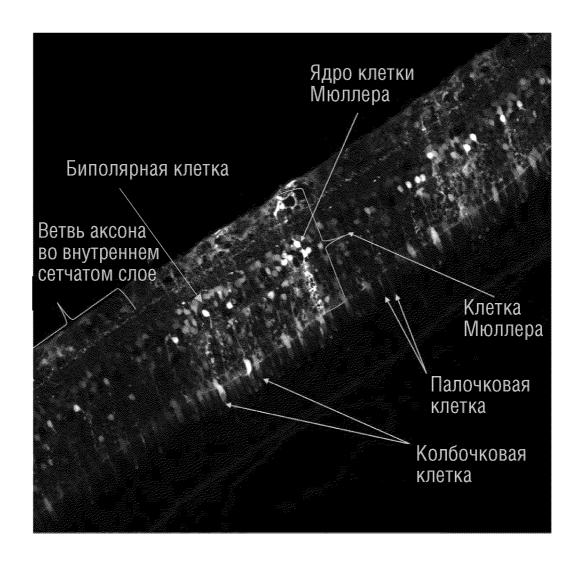
ФИГ.10С



ФИГ.10D



ФИГ.11



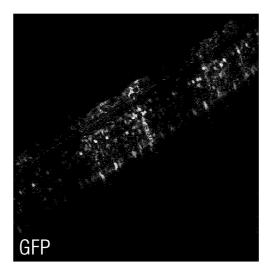
ФИГ.12А



ФИГ.12В



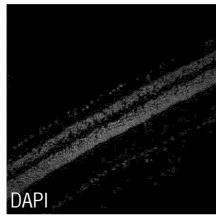
ФИГ.12С



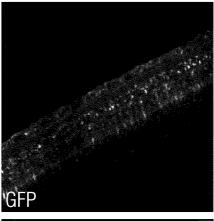
ФИГ.13А



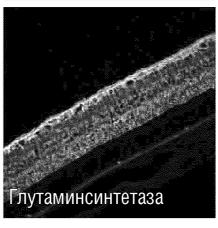
ФИГ.13В



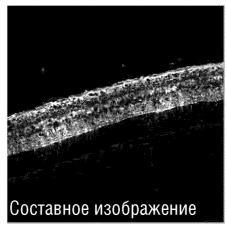
ФИГ.13С



ФИГ.13D



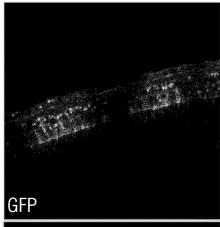
ФИГ.14А



ФИГ.14В



ФИГ.14С



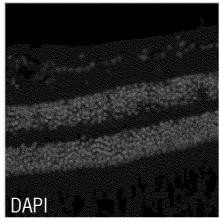
ФИГ.14D



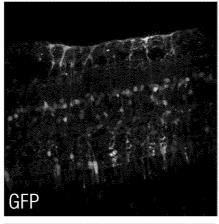
ФИГ.15А



ФИГ.15В



ФИГ.15С



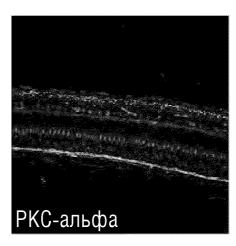
ФИГ.15D



ФИГ.16А

ФИГ.16D

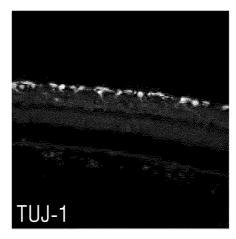




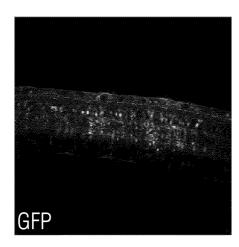
ФИГ.16В

ФИГ.16Е

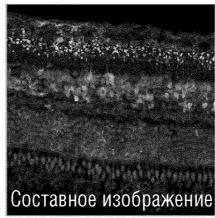




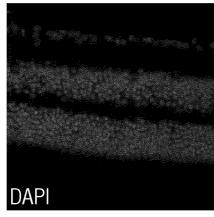
ФИГ.16С



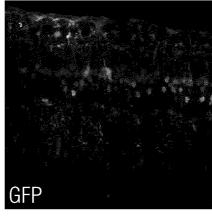
ФИГ.17А



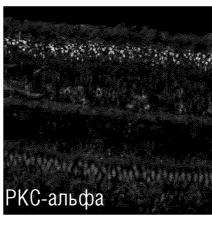
ФИГ.17В



ФИГ.17С



ФИГ.17D



ФИГ.18А

ФИГ.18D

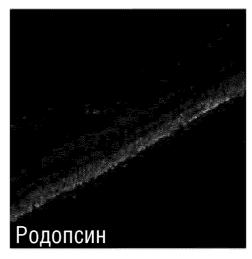




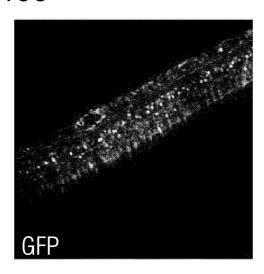
ФИГ.18В

ФИГ.18Е





ФИГ.18С



ФИГ.19А

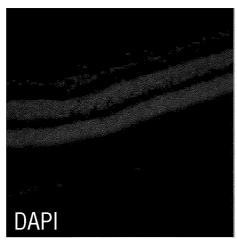
ФИГ.19D





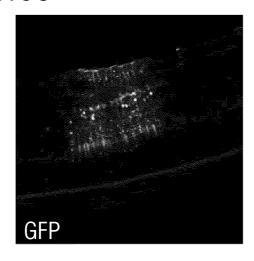
ФИГ.19В

ФИГ.19Е





ФИГ.19С



23/32

ФИГ.20А

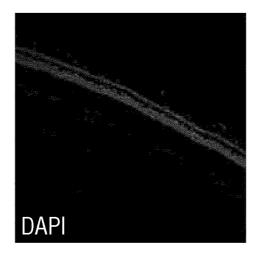
ФИГ.20D





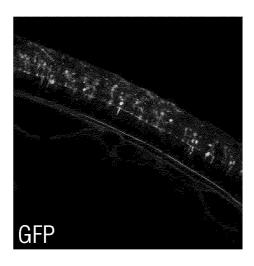
ФИГ.20В

ФИГ.20Е





ФИГ.20С

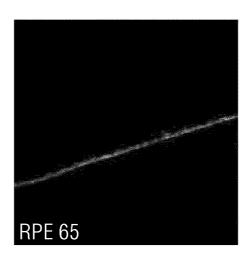


24/32

ФИГ.21А

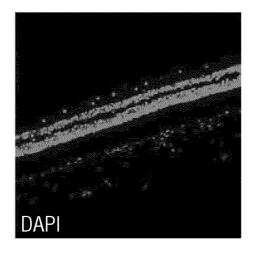
ФИГ.21D

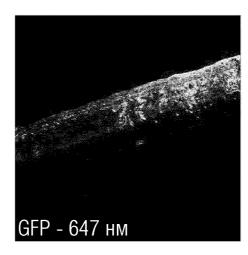




ФИГ.21В

ФИГ.21Е





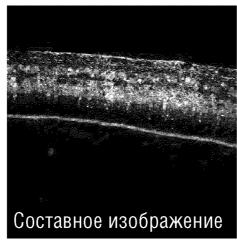
ФИГ.21С

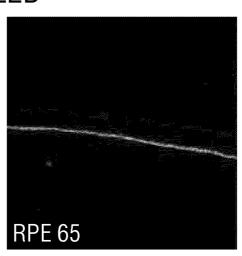


25/32

ФИГ.22А

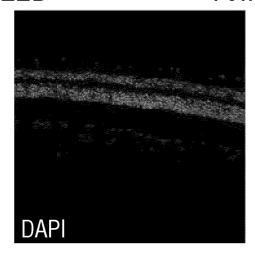
ФИГ.22D

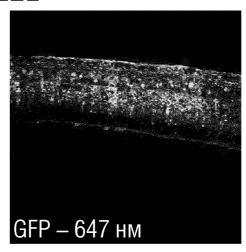




ФИГ.22В

ФИГ.22Е





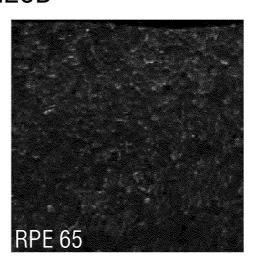
ФИГ.22С



ФИГ.23А

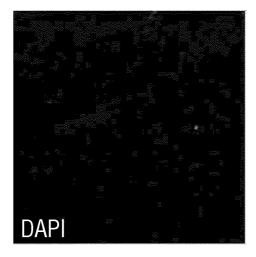
ФИГ.23D

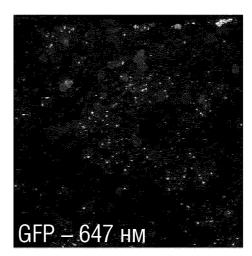




ФИГ.23В

ФИГ.23Е





ФИГ.23С

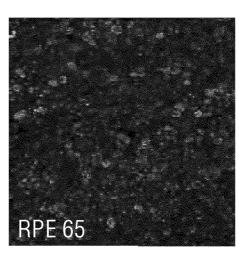


27/32

ФИГ.24А

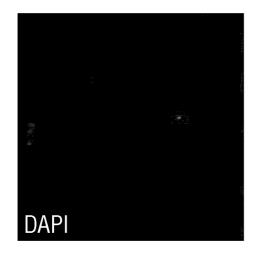
ФИГ.24D

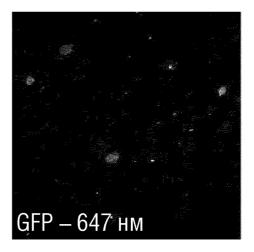




ФИГ.24В

ФИГ.24Е





ФИГ.24С

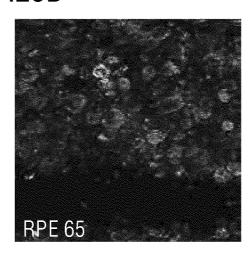


28/32

ФИГ.25А

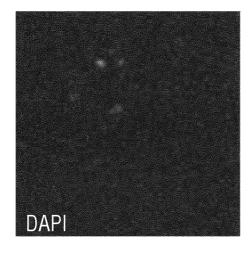
ФИГ.25D

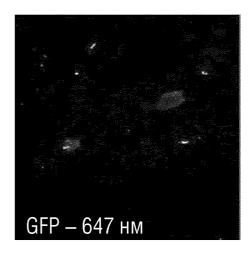




ФИГ.25В

ФИГ.25Е



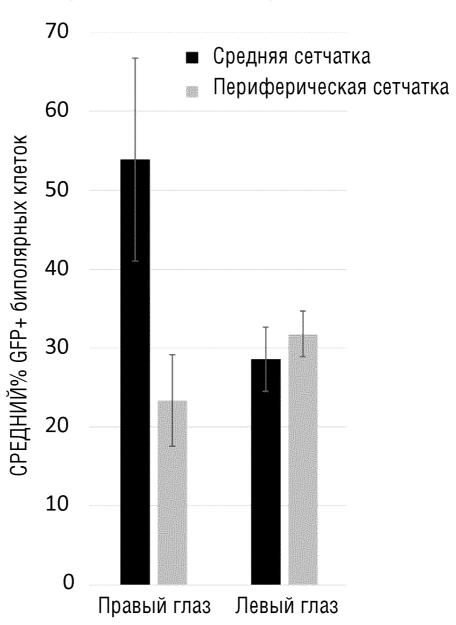


ФИГ.25С



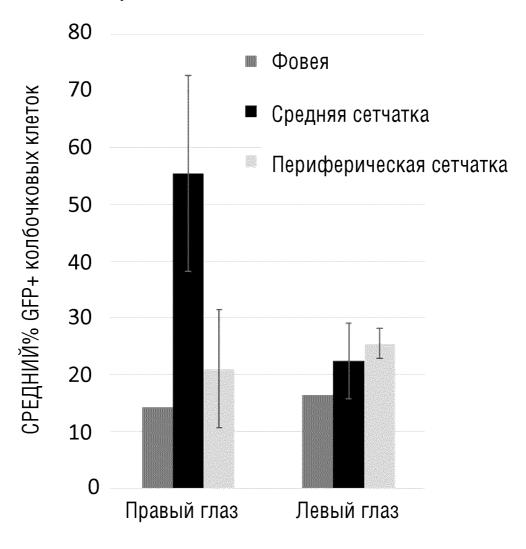
ФИГ.26А

Экспрессия GFP в биполярных клетках



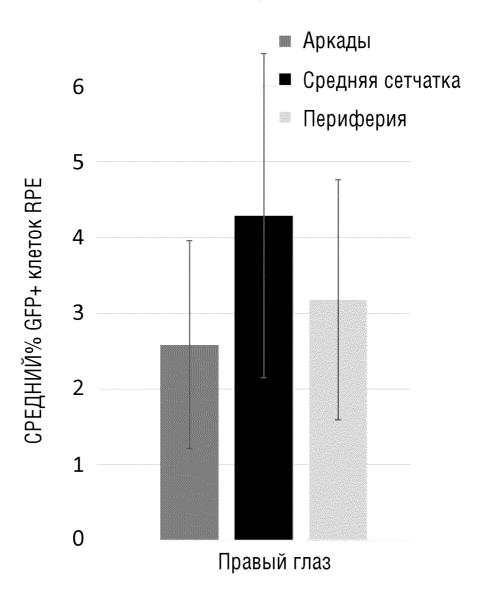
ФИГ.26В

Экспрессия GFP в колбочковых клетках

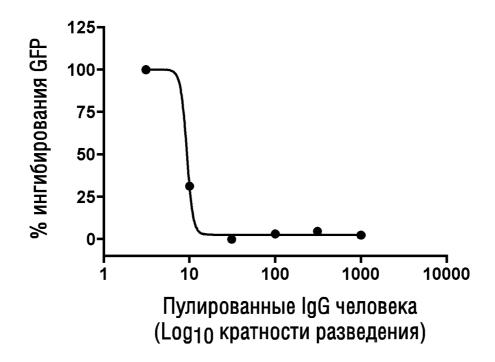


ФИГ.26С

Количественная оценка RPE



ФИГ.27А



ФИГ.27В

