

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202390984 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.08.03(51) Int. Cl. C07K 14/005 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)(22) Дата подачи заявки
2021.10.07

(54) АДЕНОАССОЦИИРОВАННЫЕ ВИРУСЫ ДЛЯ ГЛАЗНОЙ ДОСТАВКИ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ

(31) 63/088,982; 63/187,197

(32) 2020.10.07; 2021.05.11

(33) US

(86) PCT/US2021/054008

(87) WO 2022/076711 2022.04.14

(88) 2022.06.02

(71) Заявитель:
РИДЖЕНКСБИО ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

Брудер Джозеф, Ван Сюй, Ли Вэй-
Хуа, Фирнберг Элад, Йост Саманта,
Мерсер Эндрю, Лю Е, Данос Оливье,
Тепе Эйприл Р. (US)

(74) Представитель:

Строкова О.В., Гизатуллин Ш.Ф.,
Гизатуллина Е.М., Джермакян Р.В.,
Костюшенкова М.Ю., Угрюмов В.М.,
Христофоров А.А. (RU)

(57) Изобретение относится к рекомбинантным аденоассоциированным вирусам (гAAV), имеющим капсидные белки, обладающие тропизмом к ткани глаза. гAAV имеют капсиды, которые улучшают или повышают трансдукцию тканей глаза по сравнению с эталонными гAAV. Такие гAAV могут быть пригодны для доставки трансгенов, кодирующих терапевтические белки, для лечения глазных заболеваний.

Консенсусный		VR-IV	
1. AAV1 Капсид	YVIRSRITQ	NTGRTAXXQTIL	ESGXGDSNDRKQAKNW
2. AAV2 Капсид	YVIRNRITQ	NQSRSAQNKDIL	ESRGSGAGNIVQPKNW
3. AAV3 Капсид	YVIRSRITN	TPSRITTTQSRRL	ESRAGASDIRDQSKNW
4. AAV4 Капсид	YVIRNRITQ	GTTSTGTTNQSRIL	ESRAGQSMMLQAKNW
5. AAV5 Капсид	WGIQSSIT	TTGTTLNAGTATTN	ETILRLRTNFRNFKBNW
6. AAV6 Капсид	IRFVSTIN	NTGQ-----	QENLNLAGRYANTYBNW
7. AAV7 Капсид	YVIRNRITQ	NQSRSAQNKDIL	ESRSGAGNIVQPKNW
8. AAV8 Капсид	YVIRSRITQ	TTGRTANTQTIL	ESRGGQNTMANQAKNW
9. AAV9 Капсид	YVIRSRIT	-----	INGSGNQQTILKISVAGDSNMVVGNNY
10. AAVrh.10 Капсид	YVIRSRITQ	STGRTAGTQQLIL	ESRAGNNDNMAQAKNW

A1

202390984

202390984

A1

АДЕНОАССОЦИИРОВАННЫЕ ВИРУСЫ ДЛЯ ГЛАЗНОЙ ДОСТАВКИ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ

1. ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0001] В данном документе описаны рекомбинантные аденоассоциированные вирусы (rAAV), имеющие капсидные белки, которые нацелены на ткани глаза или обладают тропизмом к ним, и характеризуются улучшенной доставкой в ткани глаза, например, по сравнению с эталонным капсидом. В частности, предлагаются векторы rAAV, имеющие капсид, который представляет собой капсид AAV3B, AAVrh.73, AAVhu.26, AAV.hu.51, AAV9S454.Tfr3 или другой капсид, мишенью которого является одна или большее количество тканей глаза. Также предлагаются капсидные белки, которые направляют rAAV к тканям-мишеням и/или улучшают трансдукцию тканей глаза, включая ткань сетчатки и RPE-хориоидальную ткань, и доставляют терапевтические средства для лечения заболеваний сетчатки, в частности, неинфекционного увеита.

2. УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0002] Применение аденоассоциированных вирусов (AAV) в качестве векторов доставки генов является перспективным направлением для лечения многих заболеваний пациентов, имеющих неудовлетворенные потребности в этом. Сообщалось о десятках встречающихся в природе капсидов AAV, и изучение природного разнообразия последовательностей AAV в тканях приматов выявило более сотни вариантов, распределенных по кладам. AAV принадлежат к семейству парвовирусов и представляют собой одноцепочечные ДНК-вирусы с относительно небольшими геномами и простыми генетическими компонентами. Без вируса-хелпера AAV вызывает латентную инфекцию. Геном AAV обычно имеет ген Rep и ген Cap, фланкированные инвертированными концевыми повторами (ITR), которые служат сигналами репликации и упаковки для продуцирования вектора. Капсидные белки образуют капсиды, несущие геномную ДНК, и могут определять тропизм тканей для доставки ДНК в клетки-мишени.

[0003] Из-за низкой патогенности и перспектив долгосрочной направленной экспрессии генов рекомбинантные AAV (rAAV) применялись в качестве векторов переноса генов, в которых терапевтические последовательности упакованы в различные капсиды. Такие векторы применялись в доклинических исследованиях генной терапии, и в настоящее время более двадцати продуктов генной терапии находятся на этапе клинической разработки. Рекомбинантные AAV, такие как AAV2, продемонстрировали желаемые свойства трансдукции клеток сетчатки, и клинические испытания с применением рекомбинантного

AAV2 для лечения глазных заболеваний продолжают. Желателен тропизм к другим тканям глаза в зависимости от показаний к лечению. Попытки усилить тропизм гAAV к тканям глаза у людей имели ограниченный успех.

[0004] Сохраняется потребность в векторах гAAV с повышенной тропизмом к тканям глаза, в том числе к конкретным тканям глаза, *например*, для доставки терапевтических средств при лечении нарушений, ассоциированных с глазом, например, неинфекционного увеита. Также существует потребность в векторах гAAV с улучшенным тканеспецифическим нацеливанием и/или усиленной тканеспецифической трансдукцией для доставки терапевтических средств.

3. СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0005] Предлагаются рекомбинантные частицы AAV, которые имеют капсидные белки, направляющие гAAV к тканям-мишеням. Капсидные белки способствуют нацеливанию на ткани глаза и/или поглощению клетками и/или интеграции генома гAAV, включая нацеливание частиц гAAV на ткани переднего сегмента (роговица, радужка, цилиарное тело, шлеммов канал и/или трабекулярная сеть) или на ткани заднего сегмента (например, ткани сетчатки или RPE-хориоидальной оболочки), или зрительного нерва (глазничного сегмента или черепного сегмента), и доставляют терапевтические средства для лечения глазных заболеваний. гAAV могут содержать трансген, кодирующий терапевтический белок для лечения глазных заболеваний, и предлагаются способы введения гAAV для доставки в ткань глаза для лечения глазного заболевания или нарушения. В некоторых вариантах осуществления гAAV имеет капсид AAV серотипа 1 (AAV1; SEQ ID NO: 59); AAV серотипа 2 (AAV2; SEQ ID NO:60); AAV серотипа 3 (AAV3; SEQ ID NO:61), AAV серотипа 3B (AAV3B; SEQ ID NO:74), AAV серотипа 4 (AAV4; SEQ ID NO:62); AAV серотипа 5 (AAV5; SEQ ID NO:63); AAV серотипа 6 (AAV6; SEQ ID NO:64); AAV серотипа 7 (AAV7; SEQ ID NO:65); AAV серотипа 8 (AAV8; SEQ ID NO:66); AAV серотипа 9 (AAV9; SEQ ID NO:67); AAV серотипа 9e (AAV9e; SEQ ID NO:68); AAV серотипа rh.10 (AAVrh.10; SEQ ID NO:69); AAV серотипа rh.20 (AAVrh.20; SEQ ID NO:70); AAV серотипа hu.37 (AAVhu.37; SEQ ID NO:71), AAV серотипа rh39 (AAVrh.39; SEQ ID NO:73), AAV серотипа rh73 (AAVrh.73; SEQ ID NO:75), AAV серотипа rh.74 (AAVrh.74; SEQ ID NO:72 or SEQ ID NO:96), AAV серотипа hu51 (AAVhu.51; SEQ ID NO:76), AAV серотипа hu.21 (AAVhu.21; SEQ ID NO:77), AAV серотипа hu.12 (AAVhu.12; SEQ ID NO:78), AAV серотипа hu.26 (AAVhu.26; SEQ ID NO:79), AAV серотипа rh.24 (AAVrh.24; SEQ ID NO:87), AAV серотипа hu.38 (AAVhu.38; SEQ ID NO:88), AAV серотипа rh.72 (AAVrh.72; SEQ ID NO:89), AAV серотипа hu.56 (AAVhu.56; SEQ ID NO:86), AAV серотипа су.5 (AAVсу.5; SEQ ID NO:90),

AAV серотипа су.6 (AAVcy.6; SEQ ID NO:91), AAV серотипа rh.46 (AAVrh.46; SEQ ID NO:92), AAV серотипа rh.13 (AAVrh.13; SEQ ID NO:85), или AAV серотипа rh.64.R1 (AAVrh.64.R1; SEQ ID NO:107), или капсид представляет собой сконструированный капсид, имеющий вставку и/или одну или большее количество аминокислотных замен относительно одного из описанных в данном документе капсидов, включая AAV9.S454-TFR3 (SEQ ID NO: 42), AAV8.BBB (замена A269S (SEQ ID NO: 26)), AAV8.BBB.LD (A296S, 498_NNN/AAA_500; SEQ ID NO: 27)), AAV8.Y703F (замена Y703F в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 66, нумерацию см. на Фиг. 7), AAV9.Y443F (замена Y443F в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:67, нумерацию см. на Фиг. 7), AAV9.Y6F (замена Y6F в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:66, нумерацию см. на Фиг. 7) (см. **Фиг. 7** или **Таблицу 10**).

[0006] В определенных вариантах осуществления гAAV имеет капсид AAV3B серотипа, AAVrh.73 серотипа, AAV.hu.26 серотипа, AAVhu.51, AAVrh64R1 серотипа, или представляет собой AAV9.S454.TFR3. Определенные капсиды гAAV обладают тропизмом к специфическим тканям глаза и могут применяться для нацеливания на специфические ткани глаза. В некоторых вариантах осуществления гAAV, имеющие капсид AAV3B или AAVrh.73, можно вводить для нацеливания на радужную оболочку, сетчатку, RPE-хориоидальную оболочку или склеру, а в определенных вариантах осуществления – на цилиарное тело, шлеммов канал, трабекулярную сеть или зрительный нерв (глазничный и/или черепной сегмент). В некоторых вариантах осуществления гAAV, содержащие капсид AAV3B или AAVrh.73, можно применять для нацеливания на сетчатку и/или RPE-хориоидальную ткань. В других вариантах осуществления гAAV, содержащие капсид AAVrh.73, можно применять для нацеливания на ткань радужной оболочки, а в других вариантах осуществления капсиды AAVhu.26 можно применять для нацеливания на цилиарное тело или трабекулярную сеть. В некоторых вариантах осуществления нацеливание на цилиарное тело и/или трабекулярную сеть выполняют для лечения глаукомы. Капсиды AAV1 можно применять для нацеливания на трабекулярную сеть или склеру, а AAV7 можно применять для нацеливания на трабекулярную сеть. В определенных вариантах осуществления гAAV вводят в отсутствие гиалуроновой кислоты. гAAV можно доставлять путем интравитреального, супрахориоидального или внутрикамерного введения, и в определенных вариантах введение можно осуществлять в конкретную глазную ткань, такую как сетчатка, пигментный эпителий сетчатки, хориоидальная оболочка, склера или цилиарное тело.

[0007] Также предлагаются сконструированные капсидные белки, которые способствуют трансдукции гAAV в одной или большем количестве тканей, включая один или большее

количество типов клеток, при системном, внутривенном, внутрикамерном, супрахориоидальном или интравитреальном введении, при этом капсидные белки содержат пептид, вставленный в экспонированную на поверхности вариабельную область (VR) капсида, *например*, VR-I, VR-IV или VR-VIII, или после первой аминокислоты VP2, *например*, сразу после остатка 138 капсида AAV9 (аминокислотная последовательность SEQ ID NO:67) или сразу после соответствующего остатка другого капсида AAV, или, в альтернативном варианте, сконструирован с одной или большим количеством аминокислотных замен, описанных в данном документе, и при этом трансдукция AAV, имеющего сконструированный капсид, по меньшей мере в одной ткани, например, переднем сегменте или заднем сегменте, или в обоих, увеличивается при указанном введении по сравнению с трансдукцией AAV, имеющего соответствующий немодифицированный капсид. В определенных вариантах осуществления трансдукцию измеряют путем обнаружения трансгена, например, флуоресценцией GFP. В конкретных вариантах осуществления гAAV, имеющий сконструированный капсид, трансдуцировал ткань глаза, включая ткани переднего или заднего сегмента, трансдуцировал ткань глаза, включая передний или задний сегмент, в 1,1, 1,5, 2, 3, 5, 6 раз, в 7, 8, 9 или 10 раз больше по сравнению с трансдукцией эталонным AAV (родительский серотип AAV без вставки).

[0008] В определенных вариантах осуществления предлагаются гAAV, включающие сконструированные капсиды, описанные в данном документе, включая гAAV с геномами, содержащими трансген, представляющий терапевтический интерес. Для получения описанных в данном документе гAAV предлагаются упаковочные клетки. Также предлагаются способ лечения путем доставки фармацевтических композиций и сами фармацевтические композиции, содержащие сконструированные гAAV, описанные в данном документе. Также предлагаются способы изготовления гAAV с описанными в данном документе сконструированными капсидами.

[0009] Настоящее изобретение проиллюстрировано приведенными *ниже* примерами, описывающими изготовление сконструированных капсидов и скрининг капсидов на тропизм к тканям глаза после IV или IVT введения с применением штрих-кодированных гAAV у мышей и NHP.

3.1. Варианты осуществления

[0010] 1. Способ доставки трансгена в клетку ткани глаза, включающий приведение указанной клетки в контакт с вектором гAAV, содержащим трансген, кодирующий терапевтическое средство для лечения глазного заболевания, функционально связанный с одним или большим количеством регуляторных элементов, которые стимулируют

экспрессию терапевтического средства для лечения глазного заболевания в клетке ткани глаза, при этом гAAV имеет капсид AAV1 (SEQ ID NO: 59); AAV2 (SEQ ID NO:60); AAV3 (SEQ ID NO:61); AAV3B (SEQ ID NO:74); AAV4 (SEQ ID NO:62); AAV5 (SEQ ID NO:63); AAV6 (SEQ ID NO:64); AAV7 (SEQ ID NO:65); AAV8 (SEQ ID NO:66); AAV9 (SEQ ID NO:67); AAV9e (SEQ ID NO:68); AAVrh.10 (SEQ ID NO:69); AAVrh.20 (SEQ ID NO:70); AAVhu.37 (SEQ ID NO:71); AAVrh39 (SEQ ID NO:73); AAV rh73 (SEQ ID NO:75); AAVrh.74 (SEQ ID NO:72 или SEQ ID NO:96); AAVhu.51 (SEQ ID NO:76); AAVhu.21 (SEQ ID NO:77); AAVhu.12 (SEQ ID NO:78); AAVhu.26 (SEQ ID NO:79); AAVrh.24 (SEQ ID NO:87); AAVhu.38 (SEQ ID NO:88); AAVrh.72 (SEQ ID NO:89); AAVhu.56 (SEQ ID NO:86); AAVcy.5 (SEQ ID NO:90); AAVcy.6 (SEQ ID NO:91); AAVrh.46 (SEQ ID NO:92); AAVrh.13 (SEQ ID NO:85); AAVrh.64.R1 (SEQ ID NO:107); AAV9.S454-TFR3 (SEQ ID NO: 42); AAV8.BBB (SEQ ID NO: 26); AAV8.BBB.LD (SEQ ID NO:27); AAV8.Y703F (замена Y703F в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 66, нумерацию см. на Фиг. 7); AAV9.Y443F (замена Y443F в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 67, нумерацию см. на Фиг. 7); или AAV9.Y6F (замена Y6F в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:66, нумерацию см. на Фиг. 7).

[0011] 2. Способ доставки трансгена в ткань глаза или клетку-мишень ткани глаза или ее клеточный матрикс у субъекта, нуждающегося в этом, причем указанный способ включает введение указанному субъекту вектора гAAV, содержащего трансген, кодирующий терапевтическое средство для лечения глазного заболевания, функционально связанный с одним или большим количеством регуляторных элементов, которые стимулируют экспрессию терапевтического средства для лечения глазного заболевания в клетке ткани глаза, при этом гAAV имеет капсид AAV1 (SEQ ID NO: 59); AAV2 (SEQ ID NO:60); AAV3 (SEQ ID NO:61); AAV3B (SEQ ID NO:74); AAV4 (SEQ ID NO:62); AAV5 (SEQ ID NO:63); AAV6 (SEQ ID NO:64); AAV7 (SEQ ID NO:65); AAV8 (SEQ ID NO:66); AAV9 (SEQ ID NO:67); AAV9e (SEQ ID NO:68); AAVrh.10 (SEQ ID NO:69); AAVrh.20 (SEQ ID NO:70); AAVhu.37 (SEQ ID NO:71); AAVrh39 (SEQ ID NO:73); AAV rh73 (SEQ ID NO:75); AAVrh.74 (SEQ ID NO:72 или SEQ ID NO:96); AAVhu.51 (SEQ ID NO:76); AAVhu.21 (SEQ ID NO:77); AAVhu.12 (SEQ ID NO:78); AAVhu.26 (SEQ ID NO:79); AAVrh.24 (SEQ ID NO:87); AAVhu.38 (SEQ ID NO:88); AAVrh.72 (SEQ ID NO:89); AAVhu.56 (SEQ ID NO:86); AAVcy.5 (SEQ ID NO:90); AAVcy.6 (SEQ ID NO:91); AAVrh.46 (SEQ ID NO:92); AAVrh.13 (SEQ ID NO:85); AAVrh.64.R1 (SEQ ID NO:107); AAV9.S454-TFR3 (SEQ ID NO: 42); AAV8.BBB (SEQ ID NO: 26); AAV8.BBB.LD (SEQ ID NO:27); AAV8.Y703F (замена Y703F в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:66, нумерацию см. на Фиг. 7 для нумерации); AAV9.Y443F (замена Y443F в аминокислотной

последовательности SEQ ID NO:67, нумерацию см. на Фиг. 7); или AAV9.Y6F (замена Y6F в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:66, нумерацию см. на Фиг. 7).

[0012] 3. Способ по варианту осуществления 1 или 2, отличающийся тем, что капсид представляет собой капсид AAV3B серотипа, AAVrh.73 серотипа, AAV.hu.26 серотипа, AAVhu.51, AAVrh64R1 серотипа или капсид AAV9.S454.TFR3.

[0013] 4. Способ по любому из вариантов осуществления 1-3, отличающийся тем, что ткань глаза или клетка-мишень ткани глаза представляет собой ткань или клетку роговицы, ткань или клетку радужной оболочки, ткань или клетку цилиарного тела, ткань или клетку шлеммова канала, ткань или клетку трабекулярной сети, ткань или клетку сетчатки, ткань или клетку RPE-хориоидальной оболочки или клетку зрительного нерва.

[0014] 5. Способ по варианту осуществления 4, отличающийся тем, что ткань глаза или клетка-мишень ткани глаза представляет собой ткань или клетку сетчатки, или ткань или клетку RPE-хориоидальной оболочки.

[0015] 6. Способ по варианту осуществления 5, отличающийся тем, что капсид представляет собой капсид AAV3B или AAVrh.73.

[0016] 7. Способ по варианту осуществления 1-6, отличающийся тем, что глазное заболевание представляет собой неинфекционный увеит.

[0017] 8. Способ по варианту осуществления 1-4, отличающийся тем, что глазное заболевание представляет собой глаукому.

[0018] 9. Способ по варианту осуществления 8, отличающийся тем, что указанный гAAV нацелен на трабекулярную сеть и/или шлеммов канал.

[0019] 10. Способ по варианту осуществления 8 или 9, отличающийся тем, что капсид представляет собой капсид AAV1, капсид AAV2, AAV7, капсид AAV3B, капсид AAV.hu.26 или капсид AAV9.S454-TFR3.

[0020] 11. Способ по любому из вариантов осуществления 1-10, отличающийся тем, что указанный вектор гAAV вводят интравитреально, супрахориоидально или внутрикамерно.

[0021] 12. Способ по любому из вариантов осуществления 1-10, отличающийся тем, что указанный вектор гAAV вводят системно.

[0022] 13. Способ по любому из вариантов осуществления 1-12, отличающийся тем, что указанный вектор гAAV вводят в отсутствие гиалуроновой кислоты.

[0023] 14. Фармацевтическая композиция для применения для доставки трансгена в клетку ткани глаза, при этом указанная композиция содержит вектор гAAV, содержащий трансген, кодирующий терапевтическое средство для лечения глазного заболевания, функционально связанный с одним или большим количеством регуляторных элементов, которые стимулируют экспрессию терапевтического средства для лечения глазного

заболевания в клетке ткани глаза, при этом гAAV имеет капсид AAV1 (SEQ ID NO: 59); AAV2 (SEQ ID NO:60); AAV3 (SEQ ID NO:61); AAV3B (SEQ ID NO:74); AAV4 (SEQ ID NO:62); AAV5 (SEQ ID NO:63); AAV6 (SEQ ID NO:64); AAV7 (SEQ ID NO:65); AAV8 (SEQ ID NO:66); AAV9 (SEQ ID NO:67); AAV9e (SEQ ID NO:68); AAVrh.10 (SEQ ID NO:69); AAVrh.20 (SEQ ID NO:70); AAVhu.37 (SEQ ID NO:71); AAVrh39 (SEQ ID NO:73); AAVrh73 (SEQ ID NO:75); AAVrh.74 (SEQ ID NO:72 или SEQ ID NO:96); AAVhu.51 (SEQ ID NO:76); AAVhu.21 (SEQ ID NO:77); AAVhu.12 (SEQ ID NO:78); AAVhu.26 (SEQ ID NO:79); AAVrh.24 (SEQ ID NO:87); AAVhu.38 (SEQ ID NO:88); AAVrh.72 (SEQ ID NO:89); AAVhu.56 (SEQ ID NO:86); AAVcy.5 (SEQ ID NO:90); AAVcy.6 (SEQ ID NO:91); AAVrh.46 (SEQ ID NO:92); AAVrh.13 (SEQ ID NO:85); AAVrh.64.R1 (SEQ ID NO:107); AAV9.S454-TFR3 (SEQ ID NO: 42); AAV8.BBB (SEQ ID NO: 26); AAV8.BBB.LD (SEQ ID NO:27); AAV8.Y703F (замена Y703F в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:66, нумерацию см. на Фиг. 7 для нумерации); AAV9.Y443F (замена Y443F в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:67, нумерацию см. на Фиг. 7); или AAV9.Y6F (замена Y6F в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:66, нумерацию см. на Фиг. 7).

[0024] 15. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 14, отличающаяся тем, что капсид представляет собой капсид AAV3B серотипа, AAVrh.73 серотипа, AAVhu.26 серотипа, AAVhu.51, AAVrh64R1 серотипа или капсид AAV9.S454.TFR3.

[0025] 16. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 14 или 15, отличающаяся тем, что ткань глаза или клетка-мишень ткани глаза представляет собой ткань или клетку роговицы, ткань или клетку радужной оболочки, ткань или клетку цилиарного тела, ткань или клетку шлеммова канала, ткань или клетку трабекулярной сети, ткань или клетку сетчатки, ткань или клетку RPE-хориоидальной оболочки или клетку зрительного нерва.

[0026] 17. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 16, отличающаяся тем, что ткань глаза или клетка-мишень ткани глаза представляет собой ткань или клетку сетчатки, или ткань или клетку RPE-хориоидальной оболочки.

[0027] 18. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 17, отличающаяся тем, что капсид представляет собой капсид AAV3B или AAVrh.73.

[0028] 19. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 14-18, отличающаяся тем, что глазное заболевание представляет собой неинфекционный увеит.

[0029] 20. Фармацевтическая композиция по вариантам осуществления 14-18, отличающаяся тем, что глазное заболевание представляет собой глаукому.

[0030] 21. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 20, отличающаяся тем, что указанный гAAV нацелен на трабекулярную сеть и/или шлеммов канал.

[0031] 22. Фармацевтическая композиция по вариантам осуществления 20 или 21, отличающаяся тем, что капсид представляет собой капсид AAV3B серотипа, AAVrh.73 серотипа, AAV.hu.26 серотипа, AAVhu.51, AAVrh64R1 серотипа или капсид AAV9.S454.TFR3.

[0032] 23. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 14-22, отличающаяся тем, что указанный вектор гAAV вводят интравитреально, супрахориоидально или внутрикамерно.

[0033] 24. Способ по любому из вариантов осуществления 14-22, отличающийся тем, что указанный вектор гAAV вводят системно.

[0034] 25. Способ по варианту осуществления 14-24, отличающийся тем, что указанный вектор гAAV вводят в отсутствие гиалуроновой кислоты.

[0035] 26. Способ или фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 1-25, отличающиеся тем, что гAAV проявляет по меньшей мере в 1,1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 раз большую трансдукцию в ткани-мишени по сравнению с эталонным капсидом AAV.

[0036] 27. Способ или фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 1-26, отличающиеся тем, что относительное содержание трансгенной РНК в 1,1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 раз больше в ткани-мишени по сравнению с относительным содержанием трансгенной РНК из эталонного капсида AAV.

[0037] 28. Способ или фармацевтическая композиция по вариантам осуществления 26 или 27, отличающиеся тем, что эталонный капсид AAV представляет собой AAV2, AAV8 или AAV9.

[0038] 29. Способ лечения глазного заболевания или нарушения у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции по любому из вариантов осуществления 14-22 или 25.

[0039] 30. Способ или фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 1-29, отличающиеся тем, что лекарственное средство для лечения глазного заболевания представляет собой слитый белок VEGF, такой как афлиберцепт, антитело анти-VEGF или его антигенсвязывающий фрагмент, такое как севацизумаб, ранибизумаб, бевацизумаб или бролуцизумаб, антитело против калликреина или его антигенсвязывающий фрагмент, такое как ланаделумаб, антитело анти-IL6 или анти-IL6R, или его антигенсвязывающий фрагмент, такое как сатрализумаб, сарилумаб, силтуксимаб, клазакизумаб, сирукумаб, олокизумаб, герилимзумаб, или тоцилизумаб, антитело анти-TNF или его антигенсвязывающий фрагмент, такое как адалимумаб, инфликсимаб, голимумаб или цертолизумаб-пегол, слитый белок рецептора TNF, такой как этанерцепт,

антитело анти-С3 или его антигенсвязывающий фрагмент, такое как экулизумаб, равулизумаб или тезидолумаб, или антитело анти-С5 или его антигенсвязывающий фрагмент, такое как NGM621.

[0040] 31. Нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую капсидный белок гAAV по любому из вышеуказанных вариантов осуществления, или кодирующую аминокислотную последовательность, имеющую с ней по меньшей мере 80% идентичности.

[0041] 32. Упаковывающая клетка, способная экспрессировать нуклеиновую кислоту по варианту осуществления 31 для получения векторов AAV, содержащих капсидный белок, кодируемый указанной нуклеотидной последовательностью.

4. КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0042] На Фиг. 1 представлено сравнение последовательностей аминокислотных последовательностей капсида, включая петлю VR-IV аденоассоциированного вируса типа 9 (AAV9 VR-IV), от остатков L447 до R476 (с остатками 451-459, заключенными в квадратные скобки), с соответствующими областями других AAV. На Фигуре представлены SEQ ID NO: 49, 51-54, 50 и 55-58 соответственно, в порядке появления.

[0043] На Фиг. 2 представлена белковая модель структуры капсида AAV, демонстрирующая вариабельные области капсида VR-IV, VR-V и VR-VIII. В рамке выделена петля области VR-IV, которая обеспечивает аминокислоты, экспонированные на поверхности, как представлено в модели.

[0044] На Фиг. 3 представлена высокая эффективность упаковки (титр) в контексте количества копий генома на мл (GC/мл) AAV9 дикого типа и восьми (8) модифицированных векторов-кандидатов гAAV9 (1090, 1091, 1092, 1093, 1094, 1095, 1096 и 1097), при этом каждый из векторов-кандидатов содержит вставку FLAG сразу после разных сайтов в пределах AAV9 VR-IV, от остатков I451 до Q458, соответственно. Все векторы были упакованы с трансгеном люциферазы в 10 мл культуры; планки погрешностей представляют собой стандартную ошибку среднего значения.

[0045] Фиг. 4 демонстрирует вставки FLAG в экспонированную на поверхность петлю области I VR-IV в каждом из восьми (8) модифицированных векторов-кандидатов гAAV9 (1090, 1091, 1092, 1093, 1094, 1095, 1096 и 1097), подтвержденные иммунопреципитацией упакованных векторов путем связывания со смолой анти-FLAG.

[0046] Фиг. 5A-5B изображают эффективность трансдукции в клетках Lec2, трансдуцированных капсидными векторами, несущими ген люциферазы (в виде трансгена),

которые были упакованы либо в AAV9 дикого типа (9-luc), либо в каждый из восьми (8) модифицированных векторов-кандидатов gAAV9 (вставлен пептид FLAG) (1090, 1091, 1092, 1093, 1094, 1095, 1096 и 1097); активность трансдукции выражается в процентах активности люциферазы, принимая активность 9-luc за 100% (**Фиг. 5A**) или в относительных световых единицах (RLU) на микрограмм белка (**Фиг. 5B**).

[0047] Фиг. 6A-6E На **Фиг. 6A** представлена гистограмма, демонстрирующая, что вставки пептида непосредственно после S454 AAV9 различной длины и состава могут влиять на эффективность продуцирования частиц AAV в упаковочной клетке. Десять пептидов разного состава и длины были вставлены после S454 в AAV9 VR-IV. qPCR проводили на собранном супернатанте трансфицированных суспензионных клеток HEK293 через пять дней после трансфекции. Результаты, представленные на гистограмме, демонстрируют, что природа вставок влияет на способность частиц AAV продуцироваться и секретироваться клетками HEK293, и на это указывают общие выходы (титр). (Планки погрешностей представляют собой стандартную ошибку средней длины пептида, которая указана на оси Y в скобках.) На **Фиг. 6B-6E** представлены флуоресцентные изображения трансдуцированных клеточных культур следующих клеточных линий: (**6B**) клеточная линия Lec2, (**6C**) клеточная линия HT-22, (**6D**) клеточная линия hCMEC/D3, и (**6E**) клеточная линия C2C12. Для трансдукции указанных клеточных линий применяли капсиды AAV9 дикого типа и капсиды хоуминг-пептида со вставкой S454, содержащие трансген GFP. Вектор P1 не был включен в изображения из-за чрезвычайно низкой эффективности трансдукции, а вектор P8 не был включен из-за низкого титра. AAV9.S454.FLAG продемонстрировал низкие уровни трансдукции в каждом протестированном типе клеток.

[0048] На Фиг. 7 представлено выравнивание капсидных последовательностей AAV 1-9e, AAV3B, rh10, rh20, rh39, rh73 и rh74 версии 1 и версии 2, hu12, hu21, hu26, hu37, hu51 и hu53 с сайтами вставки для гетерологичных пептидов после иницирующего кодона VP2 и в пределах или рядом с вариабельной областью 1 (VR-I), вариабельной областью 4 (VR-IV) и вариабельной областью 8 (VR-VIII), все они выделены серым цветом; конкретный сайт вставки в восьмой вариабельной области (VR-VIII) каждого капсидного белка обозначен символом «#» (после аминокислотного остатка 588 в соответствии с нумерацией аминокислот AAV9). **Фиг. 7**, сверху вниз, демонстрирует последовательность SEQ ID NO: 59, 60, 61, 94, 74, 62, 95, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 73, 75, 72, 96, 78, 77, 79, 71, 76, 80 соответственно.

[0049] На Фиг. 8 представлены копии трансгена GFP (зеленый флуоресцентный белок) в клетках головного мозга мышей после введения векторов AAV: AAV9; AAV.PHP.eB, также обозначаемого в данном документе как AAV9e (AAV9 с пептидом TLAVPFK (SEQ ID

NO:20), вставленным между положениями 588 и 589, и модификации A587D/A588G); AAV.hDyn (AAV9 с TLAAPFK (SEQ ID NO:1) между 588 и 589); AAV.PHP.S (AAV9 с пептидом QAVRTSL (SEQ ID NO:16), вставленным между положениями 588 и 589); и AAV.PHP.SH (AAV9 с пептидом QAVRTSH (SEQ ID NO:17), вставленным между положениями 588 и 589).

[0050] На **Фиг. 9А-9С** представлены аминокислотные последовательности для рекомбинантного вектора AAV3B, включающего пептидную вставку LALGETTRPA (SEQ ID NO:9) между N588 и T589 (**Фиг. 9А, SEQ ID NO:97**), между A267 и S268 в области VR-III (**Фиг. 9В, SEQ ID NO:98**), и между G454 и T455 в области VR-IV (**Фиг. 9С, SEQ ID NO:99**), каждая со вставкой LALGETTRPA (SEQ ID NO:9), выделенной жирным шрифтом.

[0051] На **Фиг. 10А-10С** представлены аминокислотные последовательности для рекомбинантного вектора AAVrh73, включающего пептидную вставку LALGETTRPA (SEQ ID NO:9) между N590 и T591 (**Фиг. 10А, SEQ ID NO:100**), между T270 и N271 в области VR-III (**Фиг. 10В, SEQ ID NO:101**), и между G456 и G457 в области VR-IV (**Фиг. 10С, SEQ ID NO:102**), каждая со вставкой LALGETTRPA (SEQ ID NO:9), выделенной жирным шрифтом.

[0052] На **Фиг. 11А-11С** представлены аминокислотные последовательности для рекомбинантного вектора AAV8, включающего пептидную вставку LALGETTRPA (SEQ ID NO:9) между N590 и T591 (**Фиг. 11А**), между A269 и T270 в области VR-III (**Фиг. 11В**), и между T453 и T454 в области VR-IV (**Фиг. 11С**), каждая со вставкой LALGETTRPA (SEQ ID NO:9), выделенной жирным шрифтом.

[0053] На **Фиг. 12А-12В** изображен transwell-анализ *in vitro* для векторов AAV, проникающих через слой клеток гематоэнцефалического барьера (BBB) (**Фиг. 12А**), и результаты, демонстрирующие, что AAV.hDyn (обозначенный перевернутыми треугольниками) проникает через слой клеток BBB в анализе быстрее, чем AAV9 (квадраты), а также быстрее и в большей степени, чем AAV2 (круги) (**Фиг. 12В**).

[0054] На **Фиг. 13** приведены результаты анализа гДНК головного мозга мышей, которым внутривенно вводили пулы сконструированных и нативных капсидов, с помощью секвенирования следующего поколения (NGS), выявляющего относительное содержание в тканях мышей различных капсидов, входящих в пул. Мышам вводили три разных пула. Пунктирные линии указывают, какие векторы были объединены вместе. Родительский AAV9 был включен в каждый пул в качестве контроля (пул 1: BC01, пул 2: BC31, пул 3: BC01). Штрих-коды для каждого капсида пула перечислены в **Таблице 4А-4С**.

[0055] На **Фиг. 14А-14Н** приведен профиль трансдукции AAV.hDyn *in vivo* у самок мышей C57Bl/6, демонстрирующий количество копий/микрограмм гДНК у мышей, не

подвергавшихся лечению, или у мышей, которым вводили либо AAV9, либо AAV.hDyp, в головном мозге (Фиг. 14А), печени (Фиг. 14В), сердце (Фиг. 14С), легком (Фиг. 14D), почке (Фиг. 14Е), скелетной мышце (Фиг. 14F), седалищном нерве (Фиг. 14G), и в яичнике (Фиг. 14H), при этом AAV.hDyp демонстрирует повышенное биораспределение в головном мозге по сравнению с AAV9.

[0056] На Фиг. 15А-15С изображено распределение GFP из AAV.hDyp по всему головному мозгу, при этом изображения иммуногистохимического окрашивания срезов мозга из стриатума (Фиг. 15А), гиппокампа (Фиг. 15В), и коры (Фиг. 15С) выявили комплексную трансдукцию головного мозга модифицированным вектором.

[0057] На Фиг. 16А и В изображена анатомия глаза. На Фиг. 16А изображено поперечное сечение передней части глаза, а на Фиг. 16В изображена анатомия всего глаза.

[0058] На Фиг. 17А и 17В изображен анализ трансдукции гДНК *in vivo* (Фиг. 17А) и РНК (Фиг. 17В), выделенных из глаз NHP, которым с помощью IVT вводили пулы сконструированных и нативных капсидов, выявляя относительное содержание различных капсидов в пуле в типах клеток глаза NHP. Родительский AAV2.7m8 был включен в каждый пул в качестве контроля и использовался для расчета относительного количества.

[0059] Фиг. 18А - 18С. Графики, представляющие относительное содержание (относительно AAV9) ДНК и РНК гAAV, экспрессированных из трансгена, штрих-кодированного капсидом, для девяти наиболее распространенных капсидов и контролей AAV8 и AAV9 после IVT введения в NHP в тканях глаза, роговице (Фиг. 18А), радужке (Фиг. 18В) или хрусталике (Фиг. 18С). Обычный однофакторный дисперсионный анализ с апостериорными множественными сравнениями Даннета относительно AAV9 (#). $P < 0,0001$ (****); $p < 0,001$ (***); $p < 0,01$ (**); $p < 0,05$ (*). РНК, транскрибированная с трансгена, не обнаруживается в ткани роговицы или хрусталика

[0060] Фиг. 19А - 19С. Графики, представляющие относительное содержание (относительно AAV9) ДНК и РНК гAAV, экспрессированных из трансгена, штрих-кодированного капсидом, для девяти наиболее распространенных капсидов и контролей AAV8 и AAV9 после IVT введения в NHP, в цилиарном теле (Фиг. 19А), шлеммовом канале (Фиг. 19В) или трабекулярной сети (Фиг. 19С). Обычный однофакторный дисперсионный анализ с апостериорными множественными сравнениями Даннета относительно AAV9 (#). $P < 0,0001$ (****); $p < 0,001$ (***); $p < 0,01$ (**); $p < 0,05$ (*).

[0061] Фиг. 20А - 20С. Графики, представляющие относительное содержание (относительно AAV9) ДНК и РНК гAAV, экспрессированных из трансгена, штрих-кодированного капсидом, для девяти наиболее распространенных капсидов и контролей AAV8 и AAV9 после IVT введения в NHP, в сетчатке (Фиг. 20А), RPE-хориоидальной

оболочке (**Фиг. 20B**) или склере (**Фиг. 20C**). Обычный однофакторный дисперсионный анализ с апостериорными множественными сравнениями Даннета относительно AAV9 (#). $P < 0,0001$ (****); $p < 0,001$ (***); $p < 0,01$ (**); $p < 0,05$ (*).

[0062] Фиг. 21A и 21B. Графики, представляющие относительное содержание (относительно AAV9) ДНК и РНК гAAV, экспрессированных из трансгена, штрих-кодированного капсидом, для девяти наиболее распространенных капсидов и контролей AAV8 и AAV9 после IVT введения в NHP, в зрительном нерве (глазничный сегмент) (**Фиг. 21A**) или зрительном нерве (черепной сегмент) (**Фиг. 21B**). Обычный однофакторный дисперсионный анализ с апостериорными множественными сравнениями Даннета относительно AAV9 (#). $P < 0,0001$ (****); $p < 0,001$ (***); $p < 0,01$ (**); $p < 0,05$ (*). РНК, транскрибированная с трансгена, не обнаруживается в образцах зрительного нерва ни в глазничном, ни в черепном сегменте.

[0063] Фиг. 22A и 22B. Графики, представляющие относительное содержание (относительно AAV9) ДНК и РНК гAAV, экспрессированных из трансгена, штрих-кодированного капсидом, для девяти наиболее распространенных капсидов и контролей AAV8 и AAV9 после IVT введения, в ткани сетчатки у мышей (**Фиг. 22A**) или в NHP (**Фиг. 22B**). Обычный однофакторный дисперсионный анализ с апостериорными множественными сравнениями Даннета относительно AAV9 (#). $P < 0,0001$ (****); $p < 0,001$ (***); $p < 0,01$ (**); $p < 0,05$ (*).

[0064] Фиг. 23A и 23B. Графики, представляющие относительное содержание (относительно AAV9) ДНК и РНК гAAV, экспрессированных из трансгена, штрих-кодированного капсидом, для девяти наиболее распространенных капсидов и контролей AAV8 и AAV9 после IVT введения, в RPE-хориоидальной оболочке по сравнению с AAV8 или AAV9 у мышей (**Фиг. 23A**) или в NHP (**Фиг. 23B**). Обычный однофакторный дисперсионный анализ с апостериорными множественными сравнениями Даннета относительно AAV9 (#). $P < 0,0001$ (****); $p < 0,001$ (***); $p < 0,01$ (**); $p < 0,05$ (*).

[0065] Фиг. 24 демонстрирует сравнение биораспределения векторов в пуле векторов гAAV у обезьян *Cynomolgus* и мышей после IVT инъекции.

5. ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[0066] Авторы изобретения идентифицировали капсиды аденоассоциированных вирусов (AAV), которые способствуют нацеливанию рекомбинантных частиц AAV (гAAV) на ткань глаза, включая трансдукцию, поглощение клетками, интеграцию генома гAAV и экспрессию трансгенов, доставляемых в частице гAAV, в большей степени, чем гAAV с эталонным капсидом, таким как капсид AAV2, AAV8 или AAV9. Соответственно,

предлагаются рекомбинантные частицы AAV, которые имеют капсидные белки, направляющие гAAV к тканям-мишеням. Капсидные белки способствуют нацеливанию на ткани глаза и/или поглощению клетками и/или интеграции генома гAAV, включая нацеливание частиц гAAV на ткани переднего сегмента (роговица, радужка, цилиарное тело, шлеммов канал и/или трабекулярная сеть) или ткани заднего сегмента (например, ткани сетчатки или RPE-хориоидальной оболочки), или зрительного нерва (глазничного сегмента или черепного сегмента), и доставляют терапевтические средства для лечения глазных заболеваний. Включены гAAV, имеющие капсидные белки, сконструированные таким образом, чтобы они включали аминокислотные последовательности, которые придают и/или усиливают желаемые свойства, такие как нацеливание на ткани глаза, трансдукцию и интеграцию генома гAAV относительно родительского, немодифицированного капсида или эталонного капсида. гAAV могут содержать трансген, кодирующий терапевтический белок для лечения глазных заболеваний, и предлагаются способы введения гAAV для доставки в ткань глаза для лечения глазного заболевания или нарушения.

[0067] В некоторых вариантах осуществления гAAV имеет капсид AAV серотипа 1 (SEQ ID NO: 59); AAV серотипа 2 (SEQ ID NO:60); AAV серотипа 3 (SEQ ID NO:61), AAV серотипа 3B (AAV3B) (SEQ ID NO:74), AAV серотипа 4 (SEQ ID NO:62); AAV серотипа 5 (SEQ ID NO:63); AAV серотипа 6 (SEQ ID NO:64); капсид AAV7 (SEQ ID NO:65); капсид AAV8 (SEQ ID NO:66); AAV серотипа 9 (SEQ ID NO:67); AAV серотипа 9e (SEQ ID NO:68); AAV серотипа rh10 (SEQ ID NO:69); AAV серотипа rh20 (SEQ ID NO:70); и AAV серотипа hu.37 (SEQ ID NO:71), AAV серотипа rh39 (SEQ ID NO:73), AAV серотипа rh73 (SEQ ID NO:75), AAV серотипа rh74 (SEQ ID NO:72 или SEQ ID NO:96), AAV серотипа hu51 (AAV.hu51) (SEQ ID NO:76), AAV серотипа hu21 (AAV.hu21) (SEQ ID NO:77), AAV серотипа hu12 (AAV.hu12) (SEQ ID NO:78), AAV серотипа hu26 (AAV.hu26) (SEQ ID NO:79), AAV серотипа rh.24 (SEQ ID NO:87), AAV серотипа hu.38 (SEQ ID NO:88), AAV серотипа rh.72 (SEQ ID NO:89), AAV серотипа hu.56 (SEQ ID NO:86), AAV серотипа су.5 (SEQ ID NO:90), AAV серотипа су.6 (SEQ ID NO:91), AAV серотипа rh.46 (SEQ ID NO:92), AAV серотипа rh.13 (SEQ ID NO:85), или AAV серотипа rh.64.R1 (SEQ ID NO:107) или капсид представляет собой сконструированный капсид, имеющий вставку и/или одну или большее количество аминокислотных замен относительно одного из капсидов, описанных в данном документе, включая AAV9.S454-TFR3 (SEQ ID NO: 42), AAV8.BBB (замена A269S (SEQ ID NO: 26)), AAV8.BBB.LD (A296S, 498_NNN/AAA_500; SEQ ID NO:27)), AAV8.Y703F (замена Y703F в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:66, нумерацию см. на **Фиг. 7** для нумерации); AAV9.Y443F (замена Y443F в аминокислотной

последовательности SEQ ID NO:67, нумерацию см. на **Фиг. 7** для нумерации); AAV9.Y6F (замена Y6F в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:66, нумерацию см. на **Фиг. 7** для нумерации) (см. **Фиг. 7** или **Таблицу 10**).

[0068] Также предлагаются рекомбинантные векторы, содержащие капсидные белки, наряду с их фармацевтическими композициями, нуклеиновыми кислотами, кодирующими капсидные белки, и способы получения и применения капсидных белков и векторов гAAV, содержащих капсиды для целевой доставки в глаз, улучшенной трансдукции и/или лечения глазных заболеваний, ассоциированных с целевой тканью глаза. В частности, предлагаются композиции, содержащие гAAV, и способы применения капсидных белков для нацеливания гAAV на ткани глаза, включая радужную оболочку, роговицу, цилиарное тело, шлеммов канал, трабекулярную сеть, RPE-хориоидальную оболочку, сетчатку и зрительный нерв, и облегчения доставки терапевтических агентов для лечения заболеваний глаз.

[0069] В других вариантах осуществления предлагаются векторы гAAV, содержащие трансген, который является терапевтическим средством для лечения офтальмологических заболеваний, и способы лечения глазных заболеваний или нарушений, при этом капсид представляет собой капсид AAV3B серотипа, AAVrh.73 серотипа, AAV.hu.26 серотипа, AAVhu.51, AAVrh64R1 серотипа или AAV9.S454.TFR3 или другой капсид, который, как продемонстрировано в данном документе, обладает тропизмом к ткани глаза, включая роговицу, радужную оболочку, цилиарное тело хрусталика, шлеммов канал, трабекулярную сеть, сетчатку, RPE-хориоидальную оболочку, склеру или зрительный нерв. В одном варианте осуществления глазное заболевание представляет собой неинфекционный увеит. В одном варианте осуществления глазное заболевание представляет собой глаукому. Также предлагаются композиции, содержащие гAAV, содержащие пептидные вставки, которые нацеливаются или закрепляются на тканях-мишенях, таких как сетчатка, а также способы их применения.

[0070] Применяемый по тексту всего документа термин «серотип» AAV относится к AAV, имеющему иммунологически отличный капсид, встречающийся в природе капсид, или сконструированный капсид.

5.1. Определения

[0071] Термин «AAV» или «адено-ассоциированный вирус» относится к депендопарвовирусу из рода вирусов Parvoviridae. AAV может представлять собой AAV, полученный из встречающегося в природе вируса «дикого типа», AAV, полученный из генома гAAV, упакованного в капсид, содержащий капсидные белки, кодируемые

встречающимся в природе сар-геном, и/или из генома гAAV, упакованного в капсид, содержащий капсидные белки, кодируемые не встречающимся в природе капсидным сар-геном. Пример последнего включает гAAV, имеющий капсидный белок, содержащий пептидную вставку в аминокислотную последовательность встречающегося в природе капсида.

[0072] Термин «гAAV» относится к «рекомбинантному AAV». В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный AAV имеет геном AAV, в котором часть или все гер- и сар-гены заменены гетерологичными последовательностями.

[0073] Термин «хелперная плазида гер-сар» относится к плазмиде, которая обеспечивает функцию вирусных гер- и сар-генов и способствует продукции AAV из геномов гAAV, в которых отсутствуют функциональные последовательности гер- и/или сар-генов.

[0074] Термин «сар-ген» относится к последовательностям нуклеиновых кислот, которые кодируют капсидные белки, которые формируют или способствуют формированию капсидной оболочки вируса. Для AAV, капсидным белком может быть VP1, VP2 или VP3.

[0075] Термин «гер-ген» относится к последовательностям нуклеиновых кислот, которые кодируют неструктурный белок, необходимый для репликации и продукции вируса.

[0076] В контексте данного документа термины «нуклеиновые кислоты» и «нуклеотидные последовательности» включают молекулы ДНК (*например*, кДНК или геномную ДНК), молекулы РНК (*например*, мРНК), комбинации молекул ДНК и РНК или гибридные молекулы ДНК/РНК и аналоги молекул ДНК или РНК. Такие аналоги могут быть созданы с применением, например, аналогов нуклеотидов, которые включают, помимо прочего, инозин или тритилированные основания. Такие аналоги могут также включать молекулы ДНК или РНК, содержащие модифицированные остовы, которые придают молекулам полезные свойства, такие как, например, устойчивость к нуклеазам или повышенная способность проникать через клеточные мембраны. Нуклеиновые кислоты или нуклеотидные последовательности могут быть одноцепочечными, двухцепочечными, могут содержать как одноцепочечные, так и двухцепочечные части и могут содержать трехцепочечные части, но предпочтительно представляют собой двухцепочечную ДНК.

[0077] В контексте данного документа термины «субъект», «хозяин» и «пациент» применяются взаимозаменяемо. В контексте данного документа субъект представляет собой млекопитающее, например, отличное от приматов (*например*, коровы, свиньи, лошади, кошки, собаки, крысы и т. д.) или примата (*например*, обезьяну и человека), или в определенных вариантах осуществления субъект представляет собой человека.

[0078] В контексте данного документа термин «терапевтический агент» относится к любому агенту, который можно применять для лечения, контроля или облегчения

симптомов, ассоциированных с заболеванием или нарушением, когда указанное заболевание или нарушение ассоциировано с функцией, которую должен обеспечить трансген. В контексте данного документа термин «терапевтически эффективное количество» относится к количеству агента (*например*, количеству продукта, экспрессируемого трансгеном), которое обеспечивает по меньшей мере одно терапевтическое преимущество при лечении или контроле целевого заболевания или нарушения при введении субъекту, страдающему от такового. Кроме того, терапевтически эффективное количество агента по настоящему изобретению означает такое количество агента отдельно или в комбинации с другими видами терапии, которое обеспечивает по меньшей мере одно терапевтическое преимущество при лечении или контроле заболевания или нарушения.

[0079] В контексте данного документа термин «профилактический агент» относится к любому агенту, который можно применять для предотвращения, задержки или замедления прогрессирования заболевания или нарушения, когда указанное заболевание или нарушение ассоциировано с функцией, которую должен обеспечить трансген. В контексте данного документа термин «профилактически эффективное количество» относится к количеству профилактического агента (*например*, количеству продукта, экспрессируемого трансгеном), которое обеспечивает по меньшей мере одно профилактическое преимущество в предотвращении или задержке целевого заболевания или нарушения при введении субъекту, предрасположенному к таковому. Профилактически эффективное количество также может относиться к количеству агента, достаточному для предотвращения или задержки возникновения целевого заболевания или нарушения; или замедления прогрессирования целевого заболевания или нарушения; количеству, достаточному для задержки или минимизации начала развития целевого заболевания или нарушения; или количеству, достаточному для предотвращения или задержки его повторения или распространения. Профилактически эффективное количество также может относиться к количеству агента, достаточному для предотвращения или задержки обострения симптомов целевого заболевания или нарушения. Кроме того, профилактически эффективное количество в отношении профилактического агента по настоящему изобретению означает такое количество профилактического агента отдельно или в комбинации с другими агентами, которое обеспечивает по меньшей мере одно профилактическое преимущество в виде предотвращения или задержки развития заболевания или нарушения.

[0080] Профилактический агент по настоящему изобретению можно вводить субъекту, «предрасположенному» к целевому заболеванию или нарушению. Субъект, который

«предрасположен» к заболеванию или нарушению, представляет собой субъекта, у которого проявляются симптомы, ассоциированные с развитием заболевания или нарушения, или который имеет генетические характеристики, воздействие окружающей среды или другой фактор риска для такого заболевания или нарушения, но когда симптомы еще не на том уровне, чтобы диагностировать это заболевание или нарушение. Например, пациент с семейным анамнезом заболевания, ассоциированного с отсутствующим геном (должен обеспечиваться трансгеном), может квалифицироваться как предрасположенный к этому заболеванию. Кроме того, пациента со спящей опухолью, которая сохраняется после удаления первичной опухоли, можно квалифицировать как пациента, предрасположенного к рецидиву опухоли.

[0081] В контексте данного документа термин «центральная нервная система» («ЦНС») относится к нервной ткани, достигаемой циркулирующим агентом после проникновения через гематоэнцефалический барьер, и включает, например, головной мозг, зрительные нервы, черепно-мозговые нервы и спинной мозг. ЦНС также включает спинномозговую жидкость, которая заполняет центральный канал спинного мозга, а также желудочки головного мозга.

[0082] Применяемый по тексту всего документа термин «серотип» AAV относится к AAV, имеющему иммунологически отличный капсид, встречающийся в природе капсид, или сконструированный капсид.

5.2. Капсиды с нацеливанием на глаз и gAAV

5.2.1 Капсиды AAV с тропизмом к тканям глаза

[0083] В данном документе идентифицированы капсиды, обладающие тропизмом к трансдукции и экспрессии трансгенов в ткани глаза, включая определенные ткани переднего или заднего сегментов глаза, в том числе роговицу, радужную оболочку, хрусталик, цилиарное тело, шлеммов канал, трабекулярную сеть, сетчатку, RPE-хориоидальную оболочку, склеру или зрительный нерв. Ткань-мишень также может представлять собой тип «клеток сетчатки», которые включают один или большее количество типов клеток, обнаруженных в сетчатке или вблизи нее, включая амакриновые клетки, биполярные клетки, горизонтальные клетки, глиальные клетки Мюллера, фоторецепторные клетки (*например*, палочки и колбочки), ганглиозные клетки сетчатки, пигментированный эпителий сетчатки и т.п., и, в частности, фоторецепторные клетки человека (*например*, клетки-колбочки человека и/или клетки-палочки человека), горизонтальные клетки человека, биполярные клетки человека, амакриновые клетки

человека, а также ганглиозные клетки сетчатки человека (*например*, карликовые клетки, клетки-парасолы, бистратифицированные клетки, гигантские ганглиозные клетки сетчатки, светочувствительные ганглиозные клетки и/или глия Мюллера), эндотелиальные клетки во внутренней ограничивающей мембране и/или клетки пигментного эпителия сетчатки во внешней ограничивающей мембране.

[0084] В конкретных вариантах осуществления предлагаются способы доставки трансгена в ткани глаза, способы лечения глазного заболевания и фармацевтические композиции, содержащие гAAV, содержащий трансген, кодирующий терапевтическое средство для лечения глазного заболевания, при этом AAV имеет капсид AAV серотипа 1 (SEQ ID NO: 59); AAV серотипа 2 (SEQ ID NO:60); AAV серотипа 3 (SEQ ID NO:61), AAV серотипа 3В (AAV3В) (SEQ ID NO:74), AAV серотипа 4 (SEQ ID NO:62); AAV серотипа 5 (SEQ ID NO:63); AAV серотипа 6 (SEQ ID NO:64); капсид AAV7 (SEQ ID NO:65); капсид AAV8 (SEQ ID NO:66); AAV серотипа 9 (SEQ ID NO:67); AAV серотипа 9е (SEQ ID NO:68); AAV серотипа rh10 (SEQ ID NO:69); AAV серотипа rh20 (SEQ ID NO:70); и AAV серотипа hu.37 (SEQ ID NO:71), AAV серотипа rh39 (SEQ ID NO:73), AAV серотипа rh73 (SEQ ID NO:75), AAV серотипа rh74 (SEQ ID NO:72 или SEQ ID NO:96), AAV серотипа hu51 (AAV.hu51) (SEQ ID NO:76), AAV серотипа hu21 (AAV.hu21) (SEQ ID NO:77), AAV серотипа hu12 (AAV.hu12) (SEQ ID NO:78), AAV серотипа hu26 (AAV.hu26) (SEQ ID NO:79), AAV серотипа rh.24 (SEQ ID NO:87), AAV серотипа hu.38 (SEQ ID NO:88), AAV серотипа rh.72 (SEQ ID NO:89), AAV серотипа hu.56 (SEQ ID NO:86), AAV серотипа су.5 (SEQ ID NO:90), AAV серотипа су.6 (SEQ ID NO:91), AAV серотипа rh.46 (SEQ ID NO:92), AAV серотипа rh.13 (SEQ ID NO:85), или AAV серотипа rh64 (SEQ ID NO:107) или их варианты (см. **Фиг. 7** или **Таблицу 10**).

[0085] В конкретных вариантах осуществления капсид представляет собой капсид AAV3В серотипа, AAVrh.73 серотипа, AAV.hu.26 серотипа, AAVhu.51, AAVrh64R1 серотипа или капсид AAV9.S454.TFR3.

[0086] Определенные капсиды гAAV обладают тропизмом к специфическим тканям глаза и могут применяться для нацеливания на специфические ткани глаза. В некоторых вариантах осуществления гAAV, имеющие капсид AAV3В или AAVrh.73, можно вводить для нацеливания на радужную оболочку, сетчатку, RPE-хориоидальную оболочку или склеру, а в определенных вариантах осуществления – на цилиарное тело, шлеммов канал, трабекулярную сеть или зрительный нерв (глазничный и/или черепной сегмент). В некоторых вариантах осуществления гAAV, содержащие капсид AAV3В или AAVrh.73, можно применять для нацеливания на сетчатку и/или RPE-хориоидальную ткань. В других вариантах осуществления гAAV, содержащие капсид AAVrh.73, можно применять для

нацеливания на ткань радужной оболочки, а в других вариантах осуществления капсиды AAVhu.26 можно применять для нацеливания на цилиарное тело или трабекулярную сеть. Капсиды AAV1 можно применять для нацеливания на трабекулярную сеть или склеру, а AAV7 можно применять для нацеливания на трабекулярную сеть.

[0087] Частицы гAAV, которые имеют капсиды, нацеленные на ткань глаза, описанные в данном документе, обладают улучшенным нацеливанием, трансдукцией, интеграцией генома, транскрипцией мРНК трансгена и/или экспрессией трансгена в ткани глаза по сравнению с частицей эталонного гAAV, имеющей эталонный капсид, например, капсид AAV2, AAV8 или AAV9. Указанное улучшение может быть в ткани глаза в целом или может быть конкретно в ткани переднего сегмента, ткани заднего сегмента или зрительного нерва. В некоторых вариантах осуществления указанное улучшение может иметь место в радужной оболочке, сетчатке, RPE-хориоидальной оболочке, склере, цилиарном теле, шлеммовом канале, трабекулярной сети или зрительном нерве. Указанное улучшение можно оценить с помощью известных в данной области техники методик, например, описанных в Примерах 15-18 данного документа. В некоторых вариантах осуществления частицы гAAV с капсидом, нацеленным на ткань глаза, демонстрируют по меньшей мере 1,1-кратное, 1,5-кратное, 2-кратное, 3-кратное, 4-кратное, 5-кратное, 6-кратное, 7-кратное, 8-кратное, в 9-кратное или 10-кратное увеличение трансдукции или копирования генома в ткани-мишени по сравнению с эталонным капсидом AAV, которым может быть AAV2, AAV8 или AAV9, и при этом тканью-мишенью является ткань глаза, ткань переднего сегмента глаза, ткань заднего сегмента глаза, радужка, сетчатка, RPE-хориоидальная оболочка, склера, цилиарное тело, шлеммов канал, трабекулярная сеть или зрительный нерв. В некоторых вариантах осуществления частицы гAAV с капсидом, нацеленным на ткань глаза, демонстрируют по меньшей мере 1,1-кратное, 1,5-кратное, 2-кратное, 3-кратное, 4-кратное, 5-кратное, 6-кратное, 7-кратное, 8-кратное, в 9-кратное или 10-кратное увеличение экспрессии трансгенной мРНК или трансгенного белка в ткани-мишени по сравнению с относительным содержанием трансгенной РНК или белка из эталонного капсида AAV, которым может быть AAV2, AAV8 или AAV9, при этом тканью-мишенью является ткань глаза, ткань переднего сегмента глаза, ткань заднего сегмента глаза, радужка, сетчатка, RPE-хориоидальная оболочка, склера, цилиарное тело, шлеммов канал, трабекулярная сеть или зрительный нерв.

5.2.2 Сконструированные векторы гAAV с пептидными вставками

[0088] Другой аспект относится к капсидным белкам и частицам гAAV, содержащим капсидные белки, которые модифицированы путем вставки пептида и/или одной или

большого количества аминокислотных замен, для придания или усиления свойств хоуминга клеток глаза, включая усиленную трансдукцию, повышение относительного содержания или интеграции копий генома AAV, уровней транскрипции мРНК или экспрессии транскрипционного белка. Модифицированный капсид может нацеливаться на клетки сетчатки, включая амакриновые клетки, биполярные клетки, горизонтальные клетки, глиальные клетки Мюллера, фоторецепторные клетки (*например*, палочки и колбочки), ганглиозные клетки сетчатки, пигментированный эпителий сетчатки и т.п., и, в частности, фоторецепторные клетки человека (*например*, клетки-колбочки человека и/или клетки-палочки человека), горизонтальные клетки человека, биполярные клетки человека, амакриновые клетки человека, а также ганглиозные клетки сетчатки человека (*например*, карликовые клетки, клетки-парасолы, бистратифицированные клетки, гигантские ганглиозные клетки сетчатки, светочувствительные ганглиозные клетки и/или глия Мюллера), эндотелиальные клетки во внутренней ограничивающей мембране и/или клетки пигментного эпителия сетчатки человека во внешней ограничивающей мембране. Модифицированный капсид может нацеливаться на другие ткани глаза, включая ткани переднего сегмента, включая радужную оболочку, роговицу, цилиарное тело, шлеммов канал, трабекулярную сеть и ткани заднего сегмента, такие как сетчатка или RPE-хориоидальная оболочка, а также зрительный нерв.

[0089] В вариантах осуществления предлагаются модифицированные капсиды и частицы гAAV, содержащие капсиды, перечисленные в Таблице 10 или описанные в данном документе, включая AAV9.S454-TFR3 (SEQ ID NO: 42), AAV8.BBB (замена A269S (SEQ ID NO: 26)), AAV8.BBB.LD (A296S, 498_NNN/AAA_500; SEQ ID NO:27)), AAV8.Y703F (замена Y703F в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:66, нумерацию см. на Фиг. 7), AAV9.Y443F (замена Y443F в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:67, нумерацию см. на Фиг. 7), AAV9.Y6F (замена Y6F в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:66, нумерацию см. на Фиг. 7).

[0090] В конкретных вариантах осуществления пептидная вставка для нацеливания на ткань глаза представляет собой по меньшей мере или состоит из 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 смежных аминокислот RTIGPSV (SEQ ID NO: 12). В одном варианте осуществления, представляющем особый интерес, пептидная вставка содержит или состоит из аминокислотной последовательности RTIGPSV (SEQ ID NO:12).

[0091] Один аспект относится к капсидному белку рекомбинантного аденоассоциированного вируса (гAAV), капсидному белку, сконструированному для нацеливания на клетки ткани глаза. В некоторых вариантах осуществления гAAV может содержать пептидную вставку, при этом пептидная вставка экспонируется на поверхности

при упаковке в виде частицы AAV. Например, пептидная вставка может представлять собой вставку RTIGPSV (SEQ ID NO:12) или LALGETTRPA (SEQ ID NO:9) или любого другого пептида, например, пептида в Таблице 5, который включает SEQ ID NO: 1-20, представляет собой по меньшей мере по меньшей мере или состоит из 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 смежных аминокислот пептида RTIGPSV (SEQ ID NO:12) или LALGETTRPA (SEQ ID NO:9) или любого другого пептида SEQ ID NO: 1 -20. В некоторых вариантах осуществления пептидная вставка находится в пределах (т. е. между двумя аминокислотами без удаления каких-либо аминокислот капсида) варибельной области IV (VR IV) капсида AAV9 (SEQ ID NO: 118) или соответствующей области для капсида AAV другого типа, в частности, AAV3B, AAVrh73, AAV.hu.26, AAVhu.51 или AAVrh64R1 (см. Таблицу 10 и выравнивание на **Фиг. 7**). В некоторых вариантах осуществления пептидная вставка находится в пределах (т. е. между двумя аминокислотами без удаления каких-либо аминокислот капсида) варибельной области VIII (VR-VIII) капсида AAV9 или соответствующей области для капсида AAV другого типа (см. типовые выравнивания на **Фиг. 7**).

[0092] В различных вариантах осуществления капсиды гAAV и/или пептидные вставки направляют частицы гAAV к тканям-мишеням, более конкретно, в глаз, включая ткани переднего сегмента или ткани заднего сегмента, и/или способствуют поглощению, трансдукции и/или интеграции генома гAAV. Также предлагаются нуклеиновые кислоты, кодирующие сконструированные капсидные белки и их варианты, упаковочные клетки для экспрессии нуклеиновых кислот для получения векторов гAAV, векторы гAAV, дополнительно содержащие трансген, и фармацевтические композиции векторов гAAV, а также способы применения векторов гAAV для доставки трансгена в тип клетки-мишени или ткань-мишень субъекта, нуждающегося в этом.

[0093] В различных вариантах осуществления капсид гAAV специфически распознает и/или способствует трансдукции ткани глаза или, например, одного или большего количества конкретных типов клеток, например, в пределах ткани-мишени или ее клеточного матрикса. В частности, капсиды нацеливают гAAV на ткани глаза, включая радужную оболочку, роговицу, цилиарное тело, шлеммов канал, трабекулярную сеть, RPE-хориоидальную оболочку и зрительный нерв, и особенно сетчатку.

[0094] Предлагаются капсиды с пептидом, вставленным в положения, поддающиеся встраиванию пептида, в пределах и рядом с петлей VR-IV капсида AAV9 (см. **Фиг. 2**), и соответствующие области на петле VR-IV капсидов других типов AAV. Хотя в предыдущих исследованиях анализировались потенциальные положения в различных AAV, ни одно из них не определило, что AAV9 VR-IV является пригодным для этой цели

(рассмотрите, например, публикации Wu *et al*, 2000, “Mutational Analysis of the Adeno-Associated Virus Type 2 (AAV2) Capsid Gene and Construction of AAV2 Vectors with Altered Tropism,” *J of Virology* 74(18):8635-8647; Lochrie *et al*, 2006, “Adeno-associated virus (AAV) capsid genes isolated from rat and mouse liver genomic DNA define two new AAV species distantly related to AAV-5,” *Virology* 353:68-82; Shi and Bartlett, 2003, “RGD Inclusion in VP3 Provides Adeno-Associated Virus Type 2 (AAV2)-Based Vectors with a Heparan Sulfate-Independent Cell Entry Mechanism,” *Molecular Therapy* 7(4):515-525; Nicklin *et al.*, 2001, “Efficient and Selective AAV2-Mediated Gene Transfer Directed to Human Vascular Endothelial Cells” *Molecular Therapy* 4(2):174-181; Grifman *et al.*, 2001, “Incorporation of Tumor-Targeting Peptides into Recombinant Adeno-associated Virus Capsids,” *Molecular Therapy* 3(6):964-975; Girod *et al.* 1999, “Genetic capsid modifications allow efficient re-targeting of adeno-associated virus type 2,” *Nature Medicine* 3(9):1052-1056; Douar *et al.*, 2003, “Deleterious effect of peptide insertions in a permissive site of the AAV2 capsid,” *Virology* 309:203-208; а также Ponnazhagan, *et al.* 2001, *J. of Virology* 75(19):9493-9501).

[0095] Соответственно, предлагаются векторы гAAV, несущие RTIGPSV (SEQ ID NO:12), LGETTRP (SEQ ID NO:8) или LALGETTRPA (SEQ ID NO:9) или другой пептид, например, SEQ ID No: 1-20, пептидная вставка в точках вставки, в частности, в пределах экспонированных на поверхности переменных областей в оболочке капсида, в частности, в пределах или вблизи переменной области IV капсидного белка. В некоторых вариантах осуществления капсидный белок гAAV содержит пептидную вставку непосредственно после (*m.e.* соединенную пептидной связью на С-конце) аминокислотного остатка, соответствующего одной из аминокислот с 451 по 461 капсидного белка AAV9 (аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 67 и см. **Фиг. 7** для выравнивания аминокислотной последовательности капсидного белка других серотипов AAV с аминокислотной последовательностью капсида AAV9), при этом указанная пептидная вставка экспонируется на поверхность, когда капсидный белок упакован в виде частицы AAV. Например, в конкретном варианте осуществления капсидный белок AAV3B содержит пептидную вставку RTIGPSV (SEQ ID NO:12) непосредственно после (*m.e.* соединенную пептидной связью на С-конце) аминокислотного остатка, соответствующего одной из аминокислот с 449 по 459 AAV3B (SEQ ID NO:74) или аминокислот с 452 по 461 капсидного белка AAVrh73 (SEQ ID NO:75), при этом указанная пептидная вставка экспонируется на поверхность, когда капсидный белок упакован в виде частицы AAV. Пептидные вставки не должны удалять какие-либо остатки капсидного белка AAV. Как правило, пептидная вставка находится в переменной (слабо консервативной) области капсидного белка по сравнению с другими серотипами и в экспонированной на поверхности

петле.

[0096] Пептидная вставка, описанная как вставка «в» заданный сайт, относится к вставке сразу после, то есть имеющей пептидную связь с карбоксигруппой остатка, обычно обнаруживаемого в этом сайте в вирусе дикого типа. Например, вставка в Q588 в AAV9 означает, что пептидная вставка находится между Q588 и последующей аминокислотой (A589) в последовательности капсидного белка AAV9 дикого типа (SEQ ID NO:67). В вариантах осуществления отсутствует делеция аминокислотных остатков в точке вставки или рядом с ней (в пределах 5, 10, 15 остатков или в пределах структурной петли, которая является сайтом вставки). В конкретных вариантах осуществления капсидный белок представляет собой капсидный белок AAV3B или капсидный белок AAVrh73, и вставка находится сразу после по меньшей мере одного из аминокислотных остатков с 449 по 459 или с 451 по 461 соответственно. В конкретных вариантах осуществления пептидная вставка находится сразу после аминокислотных остатков Q449, G450, T451, T452, S453, G454, T455, T456, N457, Q458 или S459 капсида AAV3B или Q452, S453, T454, G455, G456, T457, A458, G459, T460 или Q461 капсида AAVrh73. В определенных вариантах осуществления пептид вставлен между остатками S454 и G455 капсидного белка AAV9, между остатками G454 и T455 капсидного белка AAV3B, между остатками G457 и T458 капсидного белка AAVrh73 или между остатками, соответствующими S454 и G455 капсидного белка AAV, отличного от капсидного белка AAV9 (аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 67). В других вариантах осуществления капсидный белок происходит по меньшей мере из одного типа AAV, выбранного из AAV серотипа 1 (AAV1), серотипа 2 (AAV2), серотипа 3 (AAV3), серотипа 3B (AAV3B) серотипа 4 (AAV4), серотипа 5 (AAV5), серотипа 6 (AAV6), серотипа 7 (AAV7), серотипа 8 (AAV8), серотипа rh8 (AAVrh8), серотипа 9e (AAV9e), серотипа rh10 (AAVrh10), серотипа rh20 (AAVrh20), серотипа rh39 (AAVrh39), серотипа rh73 (AAVrh73), серотипа hu.37 (AAVhu.37), серотипа rh74 (AAVrh74, версии 1 и 2), серотипа hu51 (AAV.hu51), серотипа hu21 (AAV.hu21), серотипа hu12 (AAV.hu12), или серотипа hu26 (AAV.hu26), (см. **Фиг. 7**), и вставка находится сразу после аминокислотного остатка, соответствующего по меньшей мере одному из аминокислотных остатков с 451 по 461 капсидного белка AAV9. Выравнивания этих различных серотипов AAV, как продемонстрировано на **Фиг. 7**, указывают на «соответствующие» аминокислотные остатки в различных аминокислотных последовательностях капсида, так что «соответствующий» аминокислотный остаток выстраивается в том же положении в выравнивании, что и остаток в эталонной последовательности. В некоторых конкретных вариантах осуществления пептидная вставка находится сразу после одного из аминокислотных остатков в пределах: 450-459 капсида

AAV1 (SEQ ID NO:59); 449-458 капсида AAV2 (SEQ ID NO:60); 449-459 капсида AAV3 (SEQ ID NO:61); 449-459 капсида AAV3B (SEQ ID NO:74), 443-453 капсида AAV4 (SEQ ID NO:62); 442-445 капсида AAV5 (SEQ ID NO:63); 450-459 капсида AAV6 (SEQ ID NO:64); 451-461 капсида AAV7 (SEQ ID NO:65); 451-461 капсида AAV8 (SEQ ID NO:66); 451-461 капсида AAV9 (SEQ ID NO:67); 452-461 капсида AAV9e (SEQ ID NO:68); 452-461 капсида AAVrh10 (SEQ ID NO:69); 452-461 капсида AAVrh20 (SEQ ID NO:70); 452-461 капсида AAVhu.37 (SEQ ID NO:71); 452-461 капсида AAVrh73; 452-461 капсида AAVrh74 (SEQ ID NO:72 или SEQ ID NO:96); 452-461 капсида AAVrh39 (SEQ ID NO:73), 449-458 капсида AAVhu12 (SEQ ID NO:78), 449-458 капсида AAVhu21 (SEQ ID NO:77), 449-458 капсида AAVhu26 (SEQ ID NO:79), или 449-458 капсида AAVhu51 (SEQ ID NO:76) в последовательностях, изображенных на **Фиг. 7**. В некоторых вариантах осуществления капсидный белок гAAV содержит пептидную вставку сразу после (*т.е.* соединенную пептидной связью на С-конце) аминокислоты 588 капсидного белка AAV9 (имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67 и см. **Фиг. 7**), при этом указанная пептидная вставка экспонируется на поверхность, когда капсидный белок упакован в виде частицы AAV. В конкретных вариантах осуществления капсидный белок гAAV содержит пептидную вставку, в частности, LALGETTRPA (SEQ ID NO:9), сразу после аминокислоты 588 капсидного белка AAV3B или сразу после аминокислоты 590 капсидного белка AAVrh73. В других вариантах осуществления капсидный белок гAAV имеет пептидную вставку, которая не находится сразу после аминокислоты 588 капсидного белка AAV9 и не соответствует аминокислоте 588 капсидного белка AAV9.

[0097] В других вариантах осуществления, когда пептид представляет собой нацеливающий пептид, включающий по меньшей мере 4 последовательных аминокислоты, или по меньшей мере 10 последовательных аминокислот, или ровно 10 последовательных аминокислот, или их функциональные фрагменты, RTIGPSV (SEQ ID NO:12), капсидный белок происходит по меньшей мере из одного типа AAV, выбранного из AAV серотипа 1 (AAV1), серотипа 2 (AAV2), серотипа 3 (AAV3), серотипа 3B (AAV3B) серотипа 4 (AAV4), серотипа 5 (AAV5), серотипа 6 (AAV6), серотипа 7 (AAV7), серотипа 8 (AAV8), серотипа rh8 (AAVrh8), серотипа 9e (AAV9e), серотипа rh10 (AAVrh10), серотипа rh20 (AAVrh20), серотипа rh39 (AAVrh39), серотипа hu.37 (AAVhu.37), серотипа rh73 (AAVrh73), серотипа rh74 (AAVrh74, версии 1 и 2), серотипа hu51 (AAV.hu51), серотипа hu21 (AAV.hu21), серотипа hu12 (AAV.hu12), или серотипа hu26 (AAV.hu26), (см. **Фиг. 7**), и пептид встраивается в капсидный белок в любом месте, так что пептид экспонируется на поверхности при включении в вектор AAV. В конкретных вариантах осуществления пептид встроен после 138; 262-272; 450-459; или 585-593 капсида AAV1 (SEQ ID NO:59);

138; 262-272; 449-458; или 584-592 капсида AAV2 (SEQ ID NO:60); 138; 262-272; 449-459; или 585-593 капсида AAV3 (SEQ ID NO:61); 138; 262-272; 449-459; или 585-593 капсида AAV3B (SEQ ID NO:74); 137; 256-262; 443-453; или 583-591 капсида AAV4 (SEQ ID NO:62); 137; 252-262; 442-445; или 574-582 капсида AAV5 (SEQ ID NO:63); 138; 262-272; 450-459; 585-593 капсида AAV6 (SEQ ID NO:64); 138; 263-273; 451-461; 586-594 капсида AAV7 (SEQ ID NO:65); 138; 263-274; 452-461; 587-595 капсида AAV8 (SEQ ID NO:66); 138; 262-273; 452-461; 585-593 капсида AAV9 (SEQ ID NO:67); 138; 262-273; 452-461; 585-593 капсида AAV9e (SEQ ID NO:68); 138; 263-274; 452-461; 587-595 капсида AAVrh10 (SEQ ID NO:69); 138; 263-274; 452-461; 587-595 капсида AAVrh20 (SEQ ID NO:70); 138; 263-274; 452-461; 587-595 капсида AAVrh73 (SEQ ID NO:75); 138; 263-274; 452-461; 587-595 капсида AAVrh74 (SEQ ID NO:72 или SEQ ID NO:96); 138; 263-274; 452-461; 587-595 капсида AAVhu37 (SEQ ID NO:71); 138; 263-274; 452-461; 587-595 капсида AAVrh39 (SEQ ID NO:734); 138; 264-271; 449-458; 584-592 капсида AAVhu12 (SEQ ID NO:78); 449-458; 584-592 капсида AAVhu21 (SEQ ID NO:77); 449-458; 584-592 капсида AAVhu26 (SEQ ID NO:79); и 449-458; 584-592 капсида AAVhu51 (SEQ ID NO:76) (как пронумеровано на **Фиг. 7**).

[0098] В некоторых вариантах осуществления капсидный белок происходит от AAV, отличного от серотипа AAV2. В некоторых вариантах осуществления вставка пептида не находится сразу после аминокислотного остатка, соответствующего аминокислоте 570 или 611 капсидного белка AAV2. В некоторых вариантах осуществления вставка пептида не находится между аминокислотными остатками, соответствующими аминокислотам 587-588 капсидного белка AAV2 (см. US 2014/0294771, Schaffer *et al*).

[0099] Также предлагаются векторы AAV, содержащие сконструированные капсиды. В некоторых вариантах осуществления векторы AAV не реплицируются и не содержат нуклеотидных последовательностей, кодирующих белки гер или сар (они поставляются упаковочными клетками при производстве векторов гAAV). В некоторых вариантах осуществления векторы на основе AAV содержат компоненты одного или большего количества серотипов AAV. В некоторых вариантах осуществления векторы на основе AAV, предложенные в настоящем изобретении, содержат капсидные компоненты одного или большего количества из следующих серотипов: AAV1, AAV2, AAV3, AAV3B, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV13, AAV14, AAV15, AAV16, AAV.rh8, AAV.rh10, AAV.rh20, AAV.rh39, AAV.rh73, AAV.rh74, AAV.RHM4-1, AAV.hu.26, AAV.hu37, AAV.Anc80, AAV.Anc80L65, AAV.7m8, AAV.PHP.B, AAV.PHP.eB, AAV2.5, AAV2tYF, AAV3B, AAV.LK03, AAV.HSC1, AAV.HSC2, AAV.HSC3, AAV.HSC4, AAV.HSC5, AAV.HSC6, AAV.HSC7, AAV.HSC8, AAV.HSC9, AAV.HSC10, AAV.HSC11,

AAV.HSC12, AAV.HSC13, AAV.HSC14, AAV.HSC15, или AAV.HSC16, или других частиц rAAV, или комбинации двух или большего количества из них. В некоторых вариантах осуществления векторы на основе AAV, представленные в настоящем документе, содержат компоненты одного или большего количества из следующих серотипов: AAV1, AAV2, AAV3, AAV3B, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV13, AAV14, AAV15, AAV16, AAV.rh8, AAV.rh10, AAV.rh20, AAV.rh39, AAV.rh73, AAV.rh74, AAV.RHM4-1, AAV.hu.26, AAV.hu37, AAV.Anc80, AAV.Anc80L65, AAV.7m8, AAV.PHP.B, AAV.PHP.eB, AAV2.5, AAV2tYF, AAV3B, AAV.LK03, AAV.HSC1, AAV.HSC2, AAV.HSC3, AAV.HSC4, AAV.HSC5, AAV.HSC6, AAV.HSC7, AAV.HSC8, AAV.HSC9, AAV.HSC10, AAV.HSC11, AAV.HSC12, AAV.HSC13, AAV.HSC14, AAV.HSC15, или AAV.HSC16, или других частиц rAAV, или комбинации двух или большего количества их серотипов. В некоторых вариантах осуществления частицы rAAV содержат капсидный белок, идентичный по меньшей мере на 80% или более, *например*, 85%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% и т. д., т.е. идентичный до 100%, *например*, с последовательностью VP1, VP2 и/или VP3 серотипа капсида AAV, выбранного из AAV1, AAV2, AAV3, AAV3B, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV13, AAV14, AAV15, AAV16, AAV.rh8, AAV.rh10, AAV.rh20, AAV.rh39, AAV.rh73, AAV.rh74, AAV.RHM4-1, AAV.hu.26, AAV.hu37, AAV.Anc80, AAV.Anc80L65, AAV.7m8, AAV.PHP.B, AAV.PHP.eB, AAV2.5, AAV2tYF, AAV3B, AAV.LK03, AAV.HSC1, AAV.HSC2, AAV.HSC3, AAV.HSC4, AAV.HSC5, AAV.HSC6, AAV.HSC7, AAV.HSC8, AAV.HSC9, AAV.HSC10, AAV.HSC11, AAV.HSC12, AAV.HSC13, AAV.HSC14, AAV.HSC15, или AAV.HSC16, или их производных, модификаций или псевдотипов. Эти сконструированные векторы AAV могут содержать геном, содержащий трансген, кодирующий терапевтический белок.

[00100] В конкретных вариантах осуществления рекомбинантный AAV для применения в композициях и способах по данному изобретению представляет собой Anc80 или Anc80L65 (см., *например*, публикацию Zinn *et al.*, 2015, *Cell Rep.* 12(6): 1056-1068, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки). В конкретных вариантах осуществления рекомбинантный AAV для применения в композициях и способах по данному изобретению представляет собой AAV.7m8 или (см., *например*, публикации US 9,193,956; US 9,458,517; US 9,587,282; US 2016/0376323, и WO 2018/075798, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки). В конкретных вариантах осуществления AAV для применения в композициях и способах по настоящему изобретению представляет собой любой AAV, описанный в US 9 585 971, такой как AAV-PHP.B. В конкретных вариантах осуществления AAV для применения в композициях и

способах по настоящему изобретению представляет собой вектор AAV2/Rec2 или AAV2/Rec3, который имеет гибридные капсидные последовательности, полученные из AAV8 и серотипов су5, rh20 или rh39 (см. *например*, публикацию Issa *et al.*, 2013, PLoS One 8(4): e60361, которая включена в данный документ посредством ссылки для этих векторов). В конкретных вариантах осуществления AAV для применения в композициях и способах по настоящему изобретению представляет собой AAV, описанный в любом из следующих документов, каждый из которых полностью включен в данный документ посредством ссылки: US 7,282,199; US 7,906,111; US 8,524,446; US 8,999,678; US 8,628,966; US 8,927,514; US 8,734,809; US 9,284,357; US 9,409,953; US 9,169,299; US 9,193,956; US 9,458,517; US 9,587,282; US 2015/0374803; US 2015/0126588; US 2017/0067908; US 2013/0224836; US 2016/0215024; US 2017/0051257; PCT/US2015/034799; and PCT/EP2015/053335. В некоторых вариантах осуществления частицы гAAV содержат капсидный белок, идентичный по меньшей мере на 80% или более, *например*, 85%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% и т. д., т.е. идентичный до 100% с последовательностью VP1, VP2 и/или VP3 капсида AAV, описанного в любом из следующих патентов и заявок на патенты, все из которых полностью включены в данный документ посредством ссылки: патенты США №№ 7,282,199; 7,906,111; 8,524,446; 8,999,678; 8,628,966; 8,927,514; 8,734,809; US 9,284,357; 9,409,953; 9,169,299; 9,193,956; 9,458,517; и 9,587,282; публикации патентных заявок США № 2015/0374803; 2015/0126588; 2017/0067908; 2013/0224836; 2016/0215024; 2017/0051257; и международные патентные заявки № PCT/US2015/034799; PCT/EP2015/053335.

[00101] В некоторых вариантах осуществления частицы гAAV содержат любой капсид AAV, описанный в патенте США № 9,840,719 и WO 2015/013313, такой как AAV.Rh74 и RHM4-1, все из которых полностью включены в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления частицы гAAV содержат любой капсид AAV, описанный в публикации WO 2014/172669, такой как AAV rh.74, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления частицы гAAV содержат капсид AAV2/5, как описано в публикациях Georgiadis *et al.*, 2016, Gene Therapy 23: 857-862 и Georgiadis *et al.*, 2018, Gene Therapy 25: 450, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления частицы гAAV содержат любой капсид AAV, описанный в публикации WO 2017/070491, такой как AAV2tYF, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления частицы гAAV содержат капсиды AAVLK03 или AAV3B, как описано в публикации Puzzo *et al.*, 2017, Sci. Transl. Med. 29(9): 418, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки. В

некоторых вариантах осуществления частицы гAAV содержат капсид AAV, описанный в патентах США № 8,628,966; US 8,927,514; US 9,923,120 и в публикации WO 2016/049230, такой как HSC1, HSC2, HSC3, HSC4, HSC5, HSC6, HSC7, HSC8, HSC9, HSC10, HSC11, HSC12, HSC13, HSC14, HSC15, или HSC16, все из которых полностью включены в данный документ посредством ссылки.

[00102] В некоторых вариантах осуществления частицы гAAV содержат капсидный белок, описанный в публикации Intl. Appl. Publ. № WO 2003/052051 (см., *например*, SEQ ID NO: 2 из публикации '051), WO 2005/033321 (см., *например*, SEQ ID NO: 123 и 88 из публикации '321), WO 03/042397 (см., *например*, SEQ ID NO: 2, 81, 85 и 97 из публикации '397), WO 2006/068888 (см., *например*, SEQ ID NO: 1 и 3-6 из публикации '888), WO 2006/110689, (см., *например*, SEQ ID NO: 5-38 из публикации '689) WO2009/104964 (см., *например*, SEQ ID NO: 1-5, 7, 9, 20, 22, 24 и 31 из публикации '964), WO 2010/127097 (см., *например*, SEQ ID NO: 5-38 из публикации '097), и WO 2015/191508 (см., *например*, SEQ ID NO: 80-294 из публикации '508), и U.S. Appl. Publ. № 20150023924 (см., *например*, SEQ ID NO: 1, 5-10 из публикации '924), содержание каждой из которых полностью включено в данное описание посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления частицы гAAV содержат капсидный белок, идентичный по меньшей мере на 80% или более, *например*, 85%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% и т. д., т.е. идентичный до 100% с последовательностью VP1, VP2 и/или VP3 капсида AAV, описанного в Intl. Appl. Publ. № WO 2003/052051 (см., *например*, SEQ ID NO: 2 из публикации '051), WO 2005/033321 (см., *например*, SEQ ID NO: 123 и 88 из публикации '321), WO 03/042397 (см., *например*, SEQ ID NO: 2, 81, 85 и 97 из публикации '397), WO 2006/068888 (см., *например*, SEQ ID NO: 1 и 3-6 из публикации '888), WO 2006/110689 (см., *например*, SEQ ID NO: 5-38 из публикации '689), WO2009/104964 (см., *например*, SEQ ID NO: 1-5, 7, 9, 20, 22, 24 и 31 из публикации '964), WO 2010/127097 (см., *например*, SEQ ID NO: 5-38 из публикации '097) и WO 2015/191508 (см., *например*, SEQ ID NO: 80-294 из публикации '508), а также U.S. Appl. Publ. № 20150023924 (см., *например*, SEQ ID NO: 1, 5-10 из публикации '924).

[00103] В дополнительных вариантах осуществления частицы гAAV содержат псевдотипированный капсид AAV. В некоторых вариантах осуществления псевдотипированные капсиды AAV представляют собой псевдотипированные капсиды AAV гAAV2/8 или гAAV2/9. Способы получения и применения псевдотипированных частиц гAAV известны в данной области техники (см., *например*, Duan *et al.*, J. Virol., 75:7662-7671 (2001); Halbert *et al.*, J. Virol., 74:1524-1532 (2000); Zolotukhin *et al.*, Methods 28:158-167 (2002); and Auricchio *et al.*, Hum. Molec. Genet. 10:3075-3081, (2001).

[00104] В определенных вариантах осуществления можно применять одноцепочечный AAV (ssAAV). В определенных вариантах осуществления можно применять самокомплементарный вектор, *например*, scAAV (см., *например*, публикации Wu, 2007, *Human Gene Therapy*, 18(2):171-82; McCarty *et al*, 2001, *Gene Therapy*, 8(16):1248-1254; US 6,596,535; US 7,125,717; и US 7,456,683, все из которых полностью включены в данный документ посредством ссылки).

[00105] Как правило, пептидная вставка представляет собой последовательность смежных аминокислот из гетерологичного белка или его домена. Пептид, который должен быть вставлен, обычно имеет достаточную длину, чтобы сохранить конкретную биологическую функцию, характеристику или особенность белка или домена, из которого он получен. Пептид, который должен быть вставлен, обычно является достаточно коротким, чтобы капсидный белок мог образовывать оболочку, аналогичную или по существу аналогичную нативному капсидному белку без вставки. В предпочтительных вариантах осуществления пептидная вставка имеет длину от около 4 до около 30 аминокислотных остатков, от около 4 до около 20, от около 4 до около 15, от около 5 до около 10 или около 7 аминокислот. Пептидные последовательности для вставки имеют длину по меньшей мере 4 аминокислоты и могут иметь длину 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления пептидные последовательности имеют длину 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления пептид имеет длину не более 7 аминокислот, 10 аминокислот или 12 аминокислот.

[00106] «Вставка пептида из гетерологичного белка» в капсидном белке AAV относится к аминокислотной последовательности, которая была введена в капсидный белок и которая не является нативной для капсида какого-либо серотипа AAV. Неограничивающие примеры включают пептид человеческого белка в капсидном белке AAV.

[00107] Авторы настоящего изобретения также неожиданно обнаружили определенные пептиды, которые можно применять для повторного нацеливания векторов AAV на определенные ткани, органы или клетки; в частности, пептиды, которые побуждают векторы гAAV нацеливаться на ткань глаза. Не ограничиваясь какой-либо одной теорией, было показано, что пептид, *например*, пептид RTIGPSV (SEQ ID NO:12), встроенный в петлю вариабельной области капсида AAV, повышает эффективность трансдукции в тканях глаза. Такие пептиды могут обеспечивать усиленный транспорт частиц AAV, инкапсулирующих трансген, через эндотелиальный клеточный матрикс.

[00108] Далее приведены сайты вставки для пептидов, описанных в данном документе, сразу после аминокислотных остатков капсидов AAV, как указано ниже (см. также **Фиг. 7**):

AAV1: 138; 262-272; 450-459; 595-593; и в конкретном варианте осуществления

между 453-454 (SEQ ID NO:59).

AAV2: 138; 262-272; 449-458; 584-592; и в конкретном варианте осуществления между 452-453 (SEQ ID NO:60).

AAV3: 138; 262-272; 449-459; 585-593; и в конкретном варианте осуществления между 452-453 (SEQ ID NO:61).

AAV3B: 138; 262-272; 449-459; 585-593; и в конкретном варианте осуществления между 452-453 (SEQ ID NO:74).

AAV4: 137; 256-262; 443-453; 583-591; и в конкретном варианте осуществления между 446-447 (SEQ ID NO:62).

AAV5: 137; 252-262; 442-445; 574-582; и в конкретном варианте осуществления между 445-446 (SEQ ID NO:63).

AAV6: 138; 262-272; 450-459; 585-593; и в конкретном варианте осуществления между 452-453 (SEQ ID NO:64).

AAV7: 138; 263-273; 451-461; 586-594; и в конкретном варианте осуществления между 453-454 (SEQ ID NO:65).

AAV8: 138; 263-274; 451-461; 587-595; и в конкретном варианте осуществления между 453-454 (SEQ ID NO:66).

AAV9: 138; 262-273; 452-461; 585-593; и в конкретном варианте осуществления между 454-455 (SEQ ID NO:67).

AAV9e: 138; 262-273; 452-461; 585-593; и в конкретном варианте осуществления между 454-455 (SEQ ID NO:68).

AAVrh10: 138; 263-274; 452-461; 587-595; и в конкретном варианте осуществления между 454-455 (SEQ ID NO:69).

AAVrh20: 138; 263-274; 452-461; 587-595; и в конкретном варианте осуществления между 454-455 (SEQ ID NO:70).

AAVrh39: 138; 263-274; 452-461; 587-595; и в конкретном варианте осуществления между 454-455 (SEQ ID NO:73).

AAV.hu12: 138; 263-274; 452-461; 584-595

AAV.hu21: 138; 264-271; 449-458; 584-592

AAV.hu26: 138; 264-271; 449-458; 584-592

AAV.hu51: 138; 264-271; 449-458; 584-592

AAVrh73: 138; 263-274; 452-461; 587-595; и в конкретном варианте осуществления между 456-457 (SEQ ID NO:75).

AAVrh74: 138; 263-274; 452-461; 587-595; и в конкретном варианте осуществления между 454-455 (SEQ ID NO. 123 или SEQ ID NO: 144).

AAVhu.37: 138; 263-274; 452-461; 587-595; и в конкретном варианте осуществления между 454-455 (SEQ ID NO: 122)

[00109] В конкретных вариантах осуществления пептидная вставка находится между аминокислотными остатками 588-589 капсида AAV9 или между соответствующими остатками капсида другого типа AAV, что определяется выравниванием аминокислотной последовательности (например, как на **Фиг. 7**). В конкретных вариантах осуществления пептидная вставка находится сразу после аминокислотных остатков с I451 по L461, S268 и Q588 капсидной последовательности AAV9 или сразу после соответствующих остатков другой капсидной последовательности AAV (**Фиг. 7**).

[00110] В некоторых вариантах осуществления в одиночной системе можно применять одну или большее количество пептидных вставок из одного или большее количество хоуминг-доменов. В некоторых вариантах осуществления капсид выбирают и/или дополнительно модифицируют для уменьшения распознавания частиц AAV иммунной системой субъекта, например, во избежание действия ранее существовавших антител у субъекта. В некоторых вариантах осуществления. В некоторых вариантах осуществления капсид выбирают и/или дополнительно модифицируют для усиления желаемого тропизма/нацеливания.

5.3. Способы получения молекул rAAV

[00111] Другой аспект настоящего изобретения включает получение описанных в данном документе молекул. В некоторых вариантах осуществления молекулу согласно настоящему изобретению получают путем обеспечения нуклеотида, содержащего последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую любую из молекул капсидного белка по настоящему изобретению; и применения системы упаковочных клеток для получения соответствующих частиц rAAV с капсидными оболочками, состоящими из капсидного белка. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты кодирует последовательность, имеющую по меньшей мере 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 99,9% идентичности последовательности с молекулой капсидного белка, описанной в данном документе, и сохраняет (или по существу сохраняет) биологическую функцию капсидного белка (включая в некоторых вариантах осуществления наличие встроенного пептида из гетерологичного белка или его домена). В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота кодирует последовательность, имеющую по меньшей мере 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98 %, 99% или 99,9% идентичности с последовательностью капсидного белка AAV9 (SEQ ID NO: 67 и см. **Фиг. 7**), при

сохранении (или существенном сохранении) биологической функции капсидного белка AAV9. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота кодирует последовательность, имеющую по меньшей мере 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98 %, 99% или 99,9% идентичности с последовательностью капсидного белка AAV1 (SEQ ID NO: 59); капсидного белка AAV2 (SEQ ID NO:60); капсидного белка AAV3 (SEQ ID NO:61); капсидного белка AAV3B (SEQ ID NO:74); капсидного белка AAV4 (SEQ ID NO:62); капсидного белка AAV5 (SEQ ID NO:63); капсидного белка AAV6 (SEQ ID NO:64); капсидного белка AAV7 (SEQ ID NO:65); капсидного белка AAV8 (SEQ ID NO:66); капсидного белка AAV9e (SEQ ID NO:68); капсидного белка AAVrh.10 (SEQ ID NO:69); капсидного белка AAVrh.20 (SEQ ID NO:70); капсидного белка AAVhu.37 (SEQ ID NO:71); капсидного белка AAVrh39 (SEQ ID NO:73); капсидного белка rh73 AAV (SEQ ID NO:75); капсидного белка AAVrh.74 (SEQ ID NO:72 или SEQ ID NO:96); капсидного белка AAVhu.51 (SEQ ID NO:76); капсидного белка AAVhu.21 (SEQ ID NO:77); капсидного белка AAVhu.12 (SEQ ID NO:78); капсидного белка AAVhu.26 (SEQ ID NO:79); капсидного белка AAVrh.24 (SEQ ID NO:87); капсидного белка AAVhu.38 (SEQ ID NO:88); капсидного белка AAVrh.72 (SEQ ID NO:89); капсидного белка AAVhu.56 (SEQ ID NO:86); капсидного белка AAVcy.5 (SEQ ID NO:90); капсидного белка AAVcy.6 (SEQ ID NO:91); капсидного белка AAVrh.46 (SEQ ID NO:92); капсидного белка AAVrh.13 (SEQ ID NO:85); капсидного белка AAVrh.64.R1 (SEQ ID NO:107); капсидного белка AAV9.S454-TFR3 (SEQ ID NO: 42); капсидного белка AAV8.BBB (SEQ ID NO: 26); капсидного белка AAV8.BBB.LD (SEQ ID NO:27); капсидного белка AAV8.Y703F (замена Y703F в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 66, нумерацию см. на Фиг. 7); капсидного белка AAV9.Y443F (замена Y443F в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:67, нумерацию см. на Фиг. 7); или капсидного белка AAV9.Y6F (замена Y6F в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:66, см. нумерацию на Фиг. 7) при сохранении (или существенном сохранении) биологической функции капсидного белка AAV9.

[00112] Капсидный белок, оболочка и частицы гAAV могут быть получены способами, известными в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления вирусный геном содержит по меньшей мере один инвертированный концевой повтор, позволяющий упаковать его в вектор. В некоторых вариантах осуществления вирусный геном дополнительно содержит сар-ген и/или гер-ген для экспрессии и сплайсинга сар-гена. В других вариантах осуществления сар- и гер-гены обеспечиваются упаковывающей клеткой и не присутствуют в вирусном геноме.

[00113] В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая

сконструированный капсидный белок, клонируется в хелперную плазмиду AAV Rep-Cap вместо существующего капсидного гена. При совместном введении в клетки-хозяева эта плазида помогает упаковать геном гAAV в сконструированный капсидный белок в качестве оболочки капсида. Упаковывающие клетки могут быть клетками любого типа, обладающими генами, необходимыми для стимуляции репликации генома AAV, сборки капсида и упаковки. Неограничивающие примеры включают клетки 293 или их производные, клетки HELA или клетки насекомых.

[00114] Стандартные способы могут применяться для рекомбинантной ДНК, синтеза олигонуклеотидов и тканевой культуры и трансформации (*например*, электропорация, липофекция). Методики ферментативных реакций и очищения могут осуществляться в соответствии с указаниями производителя или как обычно принято в данной области техники, или как описано в данном документе. Приведенные выше методики и процедуры могут обычно осуществляться в соответствии с обычными способами, хорошо известными в данной области техники, и как описано в различных общих и более конкретных справочных материалах, которые указаны и обсуждены в данном описании. См., например, публикацию Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)), которая включена в данный документ посредством ссылки для любой цели. Если не приведены конкретные определения, номенклатура, используемая в связи с описанными в данном документе лабораторными процедурами и методиками аналитической химии, синтетической органической химии, медицинской и фармацевтической химии, является хорошо известной и широко применяемой в данной области техники. Стандартные методики можно применять для химического синтеза, химического анализа, фармацевтического приготовления, составления и доставки, а также для лечения пациентов. Последовательности нуклеиновых кислот вирусных векторов на основе AAV и способы получения рекомбинантных AAV и капсидов AAV описаны, *например*, в публикациях US 7,282,199; US 7,790,449; US 8,318,480; US 8,962,332; и PCT/EP2014/076466, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки.

[00115] В некоторых вариантах осуществления гAAV, предложенные в настоящем изобретении, содержат рекомбинантный геном AAV, который содержит экспрессионную кассету, фланкированную последовательностями ITR, такими как последовательности ITR AAV2 или AAV9, при этом указанная экспрессионная кассета содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую терапевтический белок для лечения офтальмологических заболеваний. В некоторых вариантах осуществления терапевтический белок представляет собой слитый белок VEGF, такой как афлиберцепт,

антитело анти-VEGF или его антигенсвязывающий фрагмент, такое как севацизумаб, ранибизумаб, бевацизумаб или бролуцизумаб, антитело против калликреина или его антигенсвязывающий фрагмент, такое как ланаделумаб, антитело анти-IL6 или анти-IL6R, или его антигенсвязывающий фрагмент, такое как сатрализумаб, сарилумаб, силтуксимаб, клазакизумаб, сирукумаб, олокизумаб, герилимзумаб, или тоцилизумаб, антитело анти-TNF или его антигенсвязывающий фрагмент, такое как адалимумаб, инфликсимаб, голимумаб или цертолизумаб-пегол, слитый белок рецептора TNF, такой как этанерцепт, антитело анти-C3 или его антигенсвязывающий фрагмент, такое как экулизумаб, равулизумаб или тезидолумаб, или антитело анти-C5 или его антигенсвязывающий фрагмент, такое как NGM621.

[00116] В некоторых вариантах осуществления гAAV обеспечивают векторы доставки трансгена, которые можно применять в терапевтических и профилактических целях, как более подробно обсуждается ниже. В некоторых вариантах осуществления вектор гAAV также включает элементы регуляторного контроля, известные специалисту в данной области техники, которые влияют на экспрессию РНК и/или белковых продуктов, кодируемых нуклеиновыми кислотами (трансгенами), в клетках-мишенях субъекта. Элементы регуляторного контроля могут быть и тканеспецифичными, то есть активными (или по существу более активными, или значительно более активными) только в клетке/ткани-мишени. В конкретных вариантах осуществления вектор AAV содержит регуляторную последовательность, такую как промотор, функционально связанную с трансгеном, что обеспечивает экспрессию в тканях-мишенях. Промотор может быть конститутивным промотором, например, промотором CB7. Дополнительные промоторы включают: промотор цитомегаловируса (CMV), промотор вируса саркомы Рауса (RSV), промотор MMT, промотор EF-1 альфа, промотор UB6, промотор куриного бета-актина, промотор CAG, промотор RPE65 или промотор опсина. В некоторых вариантах осуществления, особенно когда может быть желательно отключить экспрессию трансгена, применяют индуцируемый промотор, *например*, индуцируемый гипоксией или индуцируемый рапамицином промотор.

[00117] В конкретных вариантах осуществления предлагается AAV3B серотип, AAVrh.73 серотип, AAV.hu.26 серотип, AAVhu.51, AAVrh64R1 серотип или капсидные векторы AAV9.S454.TFR3, содержащие вирусный геном, содержащий экспрессионную кассету для экспрессии трансгена, находящуюся под контролем регуляторных элементов и фланкированную областями ITR, и сконструированный вирусный капсид, как описано в данном документе, или который по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 99,9% идентичен аминокислотной последовательности AAV3B, AAVrh.73, AAV.hu.26,

AAVhu.51, AAVrh64R1 или капсидного белка AAV9.S454.TFR3 (SEQ ID NO: 74, 75, 79, 76, 107 и 42 соответственно; и см. **Фиг. 7**), при сохранении биологической функции AAV3B серотипа, AAVrh.73 серотипа, AAV.hu.26 серотипа, AAVhu.51 серотипа, AAVrh64R1 серотипа или капсида AAV9.S454.TFR3. В определенных вариантах осуществления кодируемый AAV3B серотип, AAVrh.73 серотип, AAV.hu.26 серотип, AAVhu.51, AAVrh64R1 серотип или капсид AAV9.S454.TFR3 имеет последовательность AAV3B серотипа, AAVrh.73 серотипа, AAV.hu.26 серотипа, AAVhu.51, AAVrh64R1 серотипа или капсида AAV9.S454.TFR3 с, кроме того, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 аминокислотными заменами относительно AAV3B серотипа, AAVrh.73 серотипа, AAV.hu.26 серотипа, AAVhu.51, AAVrh64R1 серотипа или капсида AAV9.S454.TFR3.

[00118] Рекомбинантный аденовирус может быть вектором первого поколения с делецией E1, с делецией E3 или без нее, и с экспрессионной кассетой, вставленной в любую удаленную область. Рекомбинантный аденовирус может быть вектором второго поколения, который содержит полные или частичные делеции областей E2 и E4. Хелпер-зависимый аденовирус сохраняет только инвертированные терминальные повторы аденовируса и упаковочный сигнал (ϕ). Трансген обычно встраивают между упаковочным сигналом и 3'ITR, со стопорными последовательностями или без них, чтобы сохранить размер генома близким к размеру дикого типа, составляющему приблизительно 36 т.п.н. Типовой протокол продуцирования аденовирусных векторов можно найти в публикации Alba *et al.*, 2005, "Gutless adenovirus: last generation adenovirus for gene therapy," *Gene Therapy* 12:S18-S27, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки.

[00119] Вектор гAAV для доставки трансгена к тканям-, клеткам- или органам-мишеням обладает тропностью к этой конкретной ткани-, клетке- или органу-мишени, в частности к глазу и тканям внутри глаза. Также можно применять тканеспецифические промоторы. Конструкция дополнительно может включать элементы контроля экспрессии, которые усиливают экспрессию трансгена, управляемого вектором (*например*, интроны, такие как интрон куриного β -актина, интрон минутного вируса мышей (MVM), интрон человеческого фактора IX (*например*, FIX укороченный интрон 1), донорный интрон сплайсинга β -глобина/акцепторный интрон сплайсинга тяжелой цепи иммуноглобулина, донорный интрон сплайсинга аденовируса/акцепторный интрон сплайсинга иммуноглобулина, донорный интрон сплайсинга позднего SV40/акцепторный интрон сплайсинга (19S/16S) и донорный интрон сплайсинга гибридного аденовируса /акцепторный интрон сплайсинга IgG, а также сигналы полиА, такие как сигнал полиА β -глобина кролика, сигнал полиА гормона роста человека (hGH), сигнал полиА позднего SV40, сигнал синтетического полиА

(SPA) и сигнал полиА бычьего гормона роста (bGH). См., например, Powell and Rivera-Soto, 2015, *Discov. Med.*, 19(102):49-57.

[00120] В определенных вариантах осуществления описанные в данном документе последовательности нуклеиновых кислот могут быть оптимизированы по кодонам, например, с помощью любой методики оптимизации кодонов, известного специалисту в данной области техники (см., например, обзор Quax et al., 2015, *Mol Cell* 59:149-161).

[00121] В конкретном варианте осуществления конструкции, описанные в данном документе, содержат следующие компоненты: (1) инвертированные концевые повторы AAV2, которые фланкируют экспрессионную кассету; (2) контрольные элементы, которые включают конститутивный промотор или промотор, специфичный для ткани глаза, необязательно, последовательность интрона, такого как интрон куриного β -актина и поли-А-сигнал; и (3) трансген, обеспечивающий (например, кодирующий) представляющую интерес нуклеиновую кислоту или белковый продукт. В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес белок представляет собой белок для лечения заболеваний глаза, включая, например, слитый белок VEGF, такой как афлиберцепт, антитело анти-VEGF или его антигенсвязывающий фрагмент, такое как севацизумаб, ранибизумаб, бевацизумаб или бролуцизумаб, антитело против калликреина или его антигенсвязывающий фрагмент, такое как ланаделумаб, антитело анти-IL6 или анти-IL6R, или его антигенсвязывающий фрагмент, такое как сатрализумаб, сарилумаб, силтуксимаб, клазакизумаб, сирукумаб, олокизумаб, герилимзумаб, или тоцилизумаб, антитело анти-TNF или его антигенсвязывающий фрагмент, такое как адалимумаб, инфликсимаб, голимумаб или цертолизумаб-пегол, слитый белок рецептора TNF, такой как этанерцепт, антитело анти-C3 или его антигенсвязывающий фрагмент, такое как экулизумаб, равулизумаб или тезидолумаб, или антитело анти-C5 или его антигенсвязывающий фрагмент, такое как NGM621.

[00122] Предложенные в настоящем изобретении вирусные векторы могут быть получены с использованием клеток-хозяев, например, клеток-хозяев млекопитающих, включая клетки-хозяева человека, обезьян, мышей, крыс, кроликов или хомяков. Неограничивающие примеры включают: A549, WEHI, 10T1/2, BHK, MDCK, COS1, COS7, BSC 1, BSC 40, BMT 10, VERO, W138, HeLa, 293, Saos, C2C12, L, HT1080, HepG2, первичный фибробласт, гепатоцит, а также клетки-миобласты. Как правило, клетки-хозяева стабильно трансформируют последовательностями, кодирующими трансген и ассоциированные элементы (т.е. векторный геном), и генетические компоненты для продуцирования вирусов в клетках-хозяевах, такие как гены репликации и капсида (например, гер- и сар-гены AAV). Способ получения рекомбинантных векторов AAV с

капсидами AAV8 см. в разделе IV Подробного описания патента США № 7,282,199 B2, который полностью включен в данный документ посредством ссылки. Титры копий генома указанных векторов можно определить, например, с помощью анализа TAQMAN®. Вирионы могут быть выделены, например, путем осаждения CsCl₂. В альтернативном варианте для продуцирования векторов AAV можно применять бакуловирусные системы экспрессии в клетках насекомых. Для обзора см. публикацию Aponte-Ubillus *et al.*, 2018, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102:1045-1054, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки.

[00123] Анализы *in vitro*, *например*, анализы клеточных культур, можно применять для измерения экспрессии трансгена из вектора, описанного в данном документе, что указывает, *например*, на активность вектора. Например, для оценки экспрессии трансгена можно применять PER.C6® Cell Line (Lonza), клеточную линию, полученную из клеток сетчатки эмбриона человека или клеток пигментного эпителия сетчатки, *например*, клеточную линию пигментного эпителия сетчатки hTERT RPE-1 (доступную от ATCC®). В альтернативном варианте можно применять клеточные линии, полученные из печени или других типов клеток, например, помимо прочего, клетки HuH-7, HEK293, клетки фибросаркомы HT-1080, НКВ-11 и CAP. После экспрессии можно определить характеристики экспрессированного продукта (*т.е.* трансгенного продукта), включая определение профилей гликозилирования и сульфатирования тирозина, с помощью анализов, известных в данной области техники.

5.4. Терапевтическое и профилактическое применение

[00124] Другой аспект относится к терапии, которая включает введение трансгена посредством вектора гAAV согласно настоящему изобретению субъекту, нуждающемуся в этом, для отсрочки, предотвращения, лечения и/или контроля глазного заболевания или нарушения и/или облегчения одного или большего количества симптомов, ассоциированных с ними. Субъект, нуждающийся в этом, включает субъекта, страдающего от указанного заболевания или нарушения, или субъекта, предрасположенного к этому, *например*, субъекта с риском развития или рецидива указанного заболевания или нарушения. Как правило, гAAV, несущий конкретный трансген, найдет применение в отношении данного заболевания или нарушения у субъекта, у которого нативный ген, соответствующий трансгену, дефектен относительно обеспечения правильного продукта гена или правильного количества продукта гена. Затем трансген может обеспечить копию гена, дефектного у субъекта.

[00125] Трансген может содержать кДНК, которая восстанавливает функцию белка у

субъекта, имеющего генетическую мутацию(и) в соответствующем нативном гене. В некоторых вариантах осуществления кДНК содержит ассоциированную РНК для выполнения геномной инженерии, такой как редактирование генома посредством гомологичной рекомбинации. В некоторых вариантах осуществления трансген кодирует терапевтическую РНК, такую как shРНК, искусственную miРНК или элемент, влияющий на сплайсинг.

[00126] В некоторых вариантах осуществления указанный трансген содержит нуклеотид.

[00127] Как описано в данном документе, вектор AAV может быть выбран или сконструирован, как описано в данном документе, для нацеливания на соответствующую ткань или тип клеток, включая ткань глаза, для доставки трансгена с целью осуществления терапевтического или профилактического эффекта.

[00128] В конкретных аспектах rAAV, описанные в данном документе, находят применение для доставки в ткани-мишени глаза или типы клеток тканей-мишеней глаза, включая клеточный матрикс, ассоциированный с типами клеток-мишеней, ассоциированных с нарушением или заболеванием, которое необходимо лечить/предотвращать. Заболевание или нарушение, ассоциированное с определенной тканью или типом клеток, представляет собой такое заболевание, которое в значительной степени влияет на конкретную ткань или тип клеток по сравнению с другими тканями или типами клеток организма, или такое заболевание, при котором эффекты или симптомы нарушения проявляются в определенной ткани или типе клеток. Способы доставки трансгена в ткань-мишень субъекта, нуждающегося в этом, включают введение субъекту rAAV, капсид которого обладает тропизмом к типу клеток ткани, включая усиленную трансдукцию, интеграцию генома, экспрессию мРНК трансгена и белка в ткани глаза, в том числе по сравнению с rAAV, имеющим эталонный капсид, такой как AAV2, AAV8 или AAV9.

[00129] При заболевании или нарушении, ассоциированном с сетчаткой или глазом, вектор rAAV имеет капсид с тропизмом к глазу, направляя rAAV к глазу или тканям глаза субъекта, в том числе, в вариантах осуществления, проникновение через гематоэнцефалический барьер. Термин «клетка сетчатки» относится к одному или большему количеству типов клеток, обнаруженных в сетчатке или вблизи нее, включая амакриновые клетки, биполярные клетки, горизонтальные клетки, глиальные клетки Мюллера, фоторецепторные клетки (*например*, палочки и колбочки), ганглиозные клетки сетчатки (*например*, карликовые клетки, клетки-парасолы, бистратифицированные клетки, гигантские ганглиозные клетки сетчатки и светочувствительные ганглиозные клетки), клетки пигментного эпителия сетчатки, эндотелиальные клетки во внутренней

ограничивающей мембране и т.п. К тканям глаза относятся ткани переднего сегмента, включая радужную оболочку, роговицу, хрусталик, цилиарное тело, шлеммов канал и трабекулярную сеть, а также ткани заднего сегмента, такие как сетчатка или RPE-хориоидальная оболочка, а также зрительный нерв (см. **Фиг. 16А** и **16В**).

[00130] В дополнительных вариантах осуществления предлагаются способы и композиции, в которых гAAV, содержащий рекомбинантный геном, содержащий трансген, кодирующий терапевтическое средство для лечения глазного заболевания, имеет капсид с тропизмом относительно трансдукции и/или экспрессии трансгена в ткани глаза, включая передние и/или задние сегменты, капсид AAV серотипа 1 (AAV1; SEQ ID NO: 59); AAV серотипа 2 (AAV2; SEQ ID NO:60); AAV серотипа 3 (AAV3; SEQ ID NO:61), AAV серотипа 3В (AAV3В; SEQ ID NO:74), AAV серотипа 4 (AAV4; SEQ ID NO:62); AAV серотипа 5 (AAV5; SEQ ID NO:63); AAV серотипа 6 (AAV6; SEQ ID NO:64); AAV серотипа 7 (AAV7; SEQ ID NO:65); AAV серотипа 8 (AAV8; SEQ ID NO:66); AAV серотипа 9 (AAV9; SEQ ID NO:67); AAV серотипа 9е (AAV9е; SEQ ID NO:68); AAV серотипа rh.10 (AAVrh.10; SEQ ID NO:69); AAV серотипа rh.20 (AAV.rh.20; SEQ ID NO:70); AAV серотипа hu.37 (AAVhu.37; SEQ ID NO:71), AAV серотипа rh39 (AAVrh.39; SEQ ID NO:73), AAV серотипа rh73 (AAVrh.73; SEQ ID NO:75), AAV серотипа rh.74 (AAVrh.74; SEQ ID NO:72 or SEQ ID NO:96), AAV серотипа hu51 (AAVhu.51; SEQ ID NO:76), AAV серотипа hu.21 (AAVhu.21; SEQ ID NO:77), AAV серотипа hu.12 (AAVhu.12; SEQ ID NO:78), AAV серотипа hu.26 (AAVhu.26; SEQ ID NO:79), AAV серотипа rh.24 (AAVrh.24; SEQ ID NO:87), AAV серотипа hu.38 (AAVhu.38; SEQ ID NO:88), AAV серотипа rh.72 (AAVrh.72; SEQ ID NO:89), AAV серотипа hu.56 (AAVhu.56; SEQ ID NO:86), AAV серотипа cy.5 (AAVcy.5; SEQ ID NO:90), AAV серотипа cy.6 (AAVcy.6; SEQ ID NO:91), AAV серотипа rh.46 (AAVrh.46; SEQ ID NO:92), AAV серотипа rh.13 (AAV.rh.13; SEQ ID NO:85), или AAV серотипа rh.64.R1 (AAVrh.64.R1; SEQ ID NO:107), или капсид представляет собой сконструированный капсид, имеющий вставку и/или одну или большее количество аминокислотных замен относительно одного из капсидов, описанных в данном документе, включая AAV9.S454-TFR3 (SEQ ID NO: 42), AAV8.BBB (замена A269S (SEQ ID NO: 26)), AAV8.BBB.LD (A296S, 498_NNN/AAA_500; SEQ ID NO:27)), AAV8.Y703F (замена Y703F в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:66, нумерацию см. на Фиг. 7 для нумерации); AAV9.Y443F (замена Y443F в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:67, нумерацию см. на Фиг. 7 для нумерации); AAV9.Y6F (замена Y6F в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:66, нумерацию см. на Фиг. 7 для нумерации) (см. **Фиг. 7** или **Таблицу 10**). В определенных вариантах осуществления гAAV имеет капсид AAV3В серотипа, AAVrh.73 серотипа, AAV.hu.26 серотипа, AAVhu.51, AAVrh64R1 серотипа, или

представляет собой AAV9.S454.TFR3. В конкретных вариантах осуществления гAAV вводят в отсутствие гиалуроновой кислоты, включая случаи, когда гAAV ранее не инкубировали с гиалуроновой кислотой или не смешивали с ней (включая гиалуроновую кислоту в концентрации 0,1%, 0,2%, 0,25%, 0,3%, 0,35%, 0,4%, 0,45%, 0,5%, 0,6%, 0,75% или 1,0% масс. по объему).

[00131] Как правило, если вектор гAAV обладает тропизмом к тканям глаза, вектор вводят путем инъекции *in vivo*, такой как инъекция непосредственно в глаз. Например, гAAV, содержащий пептидную вставку для повышения тропизма к ткани глаза, сетчатки или RPE-хориоидальной оболочки, можно вводить интравитреально, внутрикамерно или супрахориоидально. В некоторых вариантах осуществления гAAV с тропизмом к тканям глаза вводят посредством внутриглазной инъекции, *например*, через плоскую часть в стекловидное тело или водянистую влагу глаза. В некоторых вариантах осуществления гAAV для повышения тропизма тканей глаза вводят посредством перibuльбарной инъекции или субконъюнктивной инъекции. В некоторых вариантах осуществления гAAV с тропизмом к тканям глаза вводят посредством супрахориоидальной инъекции, то есть в пространство между склерой и хориоидальной оболочкой. Одним из преимуществ векторов гAAV с тропизмом к тканям глаза является то, что субъект может избежать хирургического вмешательства, *например*, избежать хирургического вмешательства для имплантации терапевтического средства, а вместо этого получить необходимое средство путем инъекции. В некоторых вариантах осуществления терапевтическое средство доставляется с помощью вектора гAAV, описанного в данном документе, путем внутрикамерной, интравитреальной или супрахориоидальной инъекции для обеспечения терапевтически эффективного количества для лечения заболевания или нарушения, ассоциированного с глазом, в частности, заболевания или нарушения, ассоциированного с глазом субъекта. В других вариантах осуществления лечение достигается после однократной внутрикамерной, интравитреальной или супрахориоидальной инъекции, не более двух внутрикамерных, интравитреальных или супрахориоидальных инъекций, не более трех внутрикамерных, интравитреальных или супрахориоидальных инъекций, не более четырех внутрикамерных, интравитреальных или супрахориоидальных инъекций, не более пяти внутрикамерных, интравитреальных или супрахориоидальных инъекций или не более шести внутрикамерных, интравитреальных или супрахориоидальных инъекций.

[00132] Заболевания/нарушения, ассоциированные с глазом или сетчаткой, называются «офтальмологическими заболеваниями». Неограничивающие примеры заболеваний глаз включают следующие патологии: передняя ишемическая оптическая невропатия; острая макулярная нейроретинопатия; синдром Барде-Бидля; болезнь Бехчета; окклюзия ветвей

вены сетчатки; окклюзия центральной вены сетчатки; хориоидеремия; хориоидальная неоваскуляризация; хориоретинальная дегенерация; дистрофия колбочек-палочек; нарушения цветового зрения (*например*, ахроматопсия, протанопия, дейтеранопия и тританопия); врожденная стационарная куриная слепота; диабетический увеит; нарушения эпиретинальной мембраны; наследственная дегенерация желтого пятна; гистоплазмоз; дегенерация желтого пятна (*например*, острая дегенерация желтого пятна, неэкссудативная возрастная дегенерация желтого пятна, экссудативная возрастная дегенерация желтого пятна); диабетическая ретинопатия; отек (*например*, макулярный отек, кистозный макулярный отек, диабетический макулярный отек); глаукома; врожденный амавроз Лебера; наследственная оптическая нейропатия Лебера; макулярная телеангиэктазия; многоочаговый хориоидит; диабетическая дисфункция сетчатки без ретинопатии; травма глаза; опухоли глаза; пролиферативная витреоретинопатия (PVR); ретинопатия недоношенных; ретиношизис; пигментный ретинит; окклюзионная болезнь артерий сетчатки, отслойка сетчатки, болезнь Штаргардта (fundus flavimaculatus); симпатическая офтальмия; увеальная диффузия; увеит сетчатки; синдром Ушера; синдром Фогта-Коянаги-Харада (VKH); или заболевание заднего отдела глаза, ассоциированное с глазной лазерной или фотодинамической терапией.

[00133] В конкретных вариантах осуществления заболевание или нарушение представляет собой неинфекционный увеит, оптикомиелит, дегенерацию желтого пятна, включая сухую возрастную дегенерацию желтого пятна, отек желтого пятна, диабетическую ретинопатию или глаукому.

[00134] В конкретных вариантах осуществления гAAV нацелен (включая трансдукцию и экспрессию трансгена) на одну или большее количество конкретных тканей глаза, включая ткани переднего сегмента или ткани заднего сегмента, и, в более конкретных вариантах осуществления, гAAV нацелен на роговицу, радужную оболочку или хрусталик, или цилиарное тело, шлеммов канал или трабекулярную сеть, или сетчатку, хориоидальную оболочку, пигментный эпителий сетчатки (RPE-) или склеру, или зрительный нерв. В конкретных вариантах осуществления гAAV, имеющие капсид AAV3B или AAVrh.73, можно вводить для нацеливания на радужную оболочку, сетчатку, RPE-хориоидальную оболочку или склеру, а в определенных вариантах осуществления – на цилиарное тело, шлеммов канал, трабекулярную сеть или зрительный нерв (глазничный и/или черепной сегмент). В некоторых вариантах осуществления гAAV, содержащие капсид AAV3B или AAVrh.73, можно применять для нацеливания на сетчатку и/или RPE-хориоидальную ткань. В других вариантах осуществления гAAV, содержащие капсид AAVrh.73, можно применять для нацеливания на ткань радужной оболочки, а в других вариантах

осуществления капсиды AAVhu.26 можно применять для нацеливания на цилиарное тело или трабекулярную сеть. Капсиды AAV1 можно применять для нацеливания на трабекулярную сеть или склеру, а AAV7 можно применять для нацеливания на трабекулярную сеть.

[00135] В определенных вариантах осуществления трансген содержит нуклеотидную последовательность, которая кодирует терапевтическое средство для лечения глазного заболевания, которое представляет собой слитый белок VEGF, такой как афлиберцепт, антитело анти-VEGF или его антигенсвязывающий фрагмент, такое как севацизумаб, ранибизумаб, бевацизумаб или бролуцизумаб, антитело против калликреина или его антигенсвязывающий фрагмент, такое как ланаделумаб, антитело анти-IL6 или анти-IL6R, или его антигенсвязывающий фрагмент, такое как сатрализумаб, сарилумаб, силтуксимаб, клазакизумаб, сирукумаб, олокизумаб, герилимзумаб, или тоцилизумаб, антитело анти-TNF или его антигенсвязывающий фрагмент, такое как адалимумаб, инфликсимаб, голимумаб или цертолизумаб-пегол, слитый белок рецептора TNF, такой как этанерцепт, антитело анти-C3 или его антигенсвязывающий фрагмент, такое как экулизумаб, равулизумаб или тезидолумаб, или антитело анти-C5 или его антигенсвязывающий фрагмент, такое как NGM621 или LKA-651, соланезумаб, GSK933776, леканемаб, аскринвакумаб, каротуксимаб, AND-007 или инебилизумаб. Генотерапевтические конструкции, кодирующие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, конструируют таким образом, чтобы экспрессировались как тяжелая, так и легкая цепи. Последовательности, кодирующие тяжелую и легкую цепи, могут быть сконструированы в виде единой конструкции, в которой тяжелая и легкая цепи разделены расщепляемым линкером или IRES, таким как линкер фурин-T2A или т.п., так что экспрессируются отдельные полипептиды тяжелой и легкой цепи. В определенных вариантах осуществления кодирующие последовательности кодируют Fab, или F(ab')₂, или scFv. В определенных вариантах осуществления экспрессируются полноразмерные тяжелые и легкие цепи антитела. В других вариантах осуществления конструкции экспрессируют scFv, в котором переменные домены тяжелой и легкой цепей соединены гибким нерасщепляемым линкером. Нуклеотидная последовательность, кодирующая терапевтический белок, функционально связана с регуляторными элементами для стимуляции экспрессии терапевтического белка в ткани-мишени глаза.

[00136] Векторы gAAV по настоящему изобретению также могут способствовать доставке, в частности, адресной доставке, олигонуклеотидов, лекарственных препаратов, визуализирующих агентов, неорганических наночастиц, липосом, антител к клеткам или тканям-мишеням. Векторы gAAV также могут способствовать доставке, в частности,

адресной доставке, некодирующей ДНК, РНК или олигонуклеотидов в ткани-мишени.

[00137] Агенты могут быть предоставлены в виде фармацевтически приемлемых композиций, известных в данной области техники и/или описанных в данном документе. Также молекулу гAAV по настоящему изобретению можно вводить отдельно или в комбинации с другими профилактическими и/или терапевтическими агентами.

[00138] Описанные в данном документе количества доз и частота введения охватываются терминами «терапевтически эффективный» и «профилактически эффективный». Доза и частота обычно варьируются в зависимости от факторов, специфичных для каждого пациента, в зависимости от конкретных вводимых терапевтических или профилактических агентов, тяжести и типа заболевания, пути введения, а также возраста, массы тела, клинического ответа и анамнеза заболевания, и должны определяться в соответствии с суждением практикующего врача и обстоятельствами для каждого пациента. Пригодные схемы лечения могут быть выбраны специалистом в данной области с учетом таких факторов и с соблюдением, например, дозировок, описанных в литературе и рекомендованных в Physician 's Desk Reference (56th ed., 2002). Профилактические и/или терапевтические агенты можно вводить повторно. Некоторые аспекты процедуры могут различаться, например, временной режим введения профилактических или терапевтических агентов, а также то, вводятся ли такие агенты отдельно или в виде смеси.

[00139] Количество агента по настоящему изобретению, которое будет эффективным, можно определить стандартными клиническими методами. Эффективные дозы могут быть экстраполированы из кривых доза-ответ, полученных в *in vitro* или модельных испытаний на животных системах. Для любого агента, применяемого в способах по настоящему изобретению, терапевтически эффективную дозу можно изначально оценить в анализе клеточных культур. Доза может быть составлена, используя животные модели, для достижения диапазона циркулирующей в плазме концентрации, который включает IC₅₀ (*m.e.* концентрации тестируемого соединения, которая позволяет достичь половину от максимального ингибирования симптомов), как и было определено на клеточной культуре. Такую информацию можно применять для более точного определения доз, пригодных для людей. Уровни в плазме могут быть измерены, например, с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии.

[00140] Профилактические и/или терапевтические агенты, а также их комбинации можно тестировать в подходящих системах животных моделей перед применением их у людей. Такие системы животных моделей включают, помимо прочего, крыс, мышей, кур, коров, обезьян, свиней, собак, кроликов и *m. d.* Можно применять любую систему животной модели, хорошо известную в данной области техники. Такие системы моделей широко

применяются и хорошо известны специалистам в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления применяют системы животных моделей для глазного заболевания, основанные на крысах, мышах или других мелких млекопитающих, отличных от приматов.

[00141] После того, как профилактические и/или терапевтические агенты по настоящему изобретению были испытаны на животной модели, они могут быть испытаны в клинических исследованиях для установления их эффективности. Клинические исследования будут проводиться в соответствии с общепринятыми методиками, известными специалисту в данной области техники, и могут быть установлены оптимальные дозы и пути введения, а также профили токсичности агентов по настоящему изобретению.. Например, клиническое исследование может быть разработано для тестирования молекулы гAAV по настоящему изобретению на эффективность и токсичность у пациентов-людей.

[00142] Токсичность и эффективность профилактических и/или терапевтических агентов по настоящему изобретению могут быть определены стандартными фармацевтическими процедурами в культурах клеток или на экспериментальных животных, *например*, для определения LD₅₀ (летальная доза в 50% популяции) и ED₅₀ (терапевтически эффективная доза в 50% популяции). Дозовое соотношение между токсическим и терапевтическим эффектами представляет собой терапевтический индекс и может быть выражено как соотношение LD₅₀/ED₅₀. Предпочтительны профилактические и/или терапевтические агенты, которые проявляют высокие терапевтические индексы. Хотя могут применяться профилактические и/или терапевтические агенты, которые проявляют токсичные побочные эффекты, следует позаботиться о разработке системы доставки, которая нацеливает такие агенты на участок пораженной ткани, чтобы свести к минимуму потенциальный ущерб неинфицированным клеткам и, таким образом, уменьшить побочные эффекты.

[00143] Обычно гAAV вводят в течение времени и в количестве, эффективном для получения желаемого терапевтического и/или профилактического эффекта. Данные, полученные в результате анализов клеточных культур и исследований на животных, можно применять для определения диапазона доз и/или схемы введения профилактических и/или терапевтических агентов для применения у людей. Дозировка таких агентов находится в диапазоне циркулирующих концентраций, который включает ED₅₀ с малой токсичностью или без токсичности. Дозировка может варьироваться в пределах этого диапазона в зависимости от применяемой лекарственной формы и используемого пути введения.

[00144] Терапевтически эффективная доза вектора гAAV для пациентов обычно составляет от около 0,1 мл до около 100 мл раствора, содержащего концентрации от около 1×10^9 до

около 1×10^{16} геномов, или от около 1×10^{10} до около 1×10^{15} геномов, от около 1×10^{12} до около 1×10^{16} геномов, от около 1×10^{14} до около 1×10^{16} геномов, от около 1×10^{11} до около 1×10^{13} геномов, или от около 1×10^{12} до около 1×10^{14} геномов. Уровни экспрессии трансгена можно отслеживать для определения/корректировки дозировки, частоты, схемы и т.п.

[00145] Лечение субъекта терапевтически или профилактически эффективным количеством агентов по настоящему изобретению может включать один курс лечения или серию курсов лечения. Например, фармацевтические композиции, содержащие агент по настоящему изобретению, могут быть введены однократно или могут быть введены 2, 3 или 4 раза, например, с промежутком в неделю, месяц, 2 месяца или три месяца.

[00146] Молекулы gAAV по настоящему изобретению можно вводить отдельно или в комбинации с другими профилактическими и/или терапевтическими агентами. Каждый профилактический или терапевтический агент можно вводить одновременно или последовательно в любом порядке в разные моменты времени; однако, если их не вводить одновременно, их следует вводить достаточно близко по времени, чтобы обеспечить желаемый терапевтический или профилактический эффект. Каждое терапевтический агент можно вводить отдельно, в любой подходящей форме и любым пригодным путем.

[00147] В различных вариантах осуществления различные профилактические и/или терапевтические агенты вводят с интервалом менее 1 часа, около 1 часа, от около 1 часа до около 2 часов, от около 2 до около 3 часов, от около 3 часов до около 4 часов, от около 4 часов до около 5 часов, от около 5 часов до около 6 часов, от около 6 часов до около 7 часов, от около 7 часов до около 8 часов, от около 8 часов до около 9 часов, от около 9 часов до около 10 часов, от около 10 часов до около 11 часов, от около 11 часов до около 12 часов, не более чем 24 часов или с интервалом не более 48 часов. В определенных вариантах осуществления два или большее количество агентов вводят в течение одного визита пациента.

[00148] Способы введения агентов, описанные в данном документе, включают, помимо прочего, парентеральное введение (*например*, внутрикожное, внутримышечное, внутрибрюшинное, внутривенное и подкожное, включая инфузию или болюсную инъекцию), эпидуральное введение, а также введение путем абсорбции через эпителиальные или слизисто-кожные или слизистые оболочки (*например*, интраназально, через слизистую оболочку полости рта, слизистую оболочку прямой кишки и кишечника и т.д.). В конкретных вариантах осуществления, например, когда трансген предназначен для экспрессии в глазу, вектор вводят посредством интравитреальной, внутриглазной, супрахориоидальной или внутрикамерной инъекции. В конкретных вариантах осуществления вектор вводят непосредственно в ткань-мишень, например, вводят

непосредственно в сетчатку или цилиарное тело.

[00149] В определенных вариантах осуществления агенты по настоящему изобретению вводят внутривенно и их можно вводить вместе с другими биологически активными агентами.

[00150] В другом конкретном варианте осуществления агенты по настоящему изобретению могут быть доставлены в виде состава с замедленным высвобождением, *например*, когда составы обеспечивают пролонгированное высвобождение и, таким образом, увеличенный период полувыведения вводимого агента. Системы с контролируемым высвобождением, пригодные для применения, включают, помимо прочего, системы с высвобождением, контролируемым диффузией, растворителем и химическими веществами. Системы с высвобождением, контролируемым диффузией, включают, например, резервуарные устройства, в которых молекулы по настоящему изобретению заключены внутри устройства, так что высвобождение молекул контролируется проникновением через диффузионный барьер. Обычные резервуарные устройства включают, например, мембраны, капсулы, микрокапсулы, липосомы и полые волокна. Монолитные (матричные) устройства представляют собой второй тип системы с высвобождением, контролируемым диффузией, в которой двойные антигенсвязывающие молекулы диспергированы или растворены в контролирующей скорости матрице (*например*, полимерной матрице). Агенты по настоящему изобретению могут быть однородно диспергированы в контролирующей скорости матрице, и при этом скорость высвобождения контролируется диффузией через матрицу. Полимеры, пригодные для применения в монолитном матричном устройстве, включают встречающиеся в природе полимеры, синтетические полимеры и синтетически модифицированные природные полимеры, а также производные полимеров.

[00151] Любая методика, известная специалисту в данной области техники, может применяться для получения составов с большим количеством агентов, описанным в данном документе. См., *например*, патент США № 4,526,938; публикацию PCT WO 91/05548; публикацию PCT WO 96/20698; Ning et al., "Intratumoral Radioimmunotherapy of a Human Colon Cancer Xenograft Using a Sustained-Release Gel," *Radiotherapy & Oncology*, 39:179 189, 1996; Song et al., "Antibody Mediated Lung Targeting of Long-Circulating Emulsions," *PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology*, 50:372 397, 1995; Cleek et al., "Biodegradable Polymeric Carriers for a bFGF Antibody for Cardiovascular Application," *Pro. Intl. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.*, 24:853 854, 1997; and Lam et al., "Microencapsulation of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody for Local Delivery," *Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater.*, 24:759 760, 1997, каждая из которых полностью включена в данный

документ посредством ссылки. В одном варианте осуществления в системе с контролируемым высвобождением можно использовать насос (см. Langer, *выше*; Sefton, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.*, 14:20, 1987; Buchwald et al., *Surgery*, 88:507, 1980; и Saudek et al., *N. Engl. J. Med.*, 321:574, 1989). В другом варианте осуществления полимерные материалы можно применять для достижения контролируемого высвобождения агентов, содержащих двойную антигенсвязывающую молекулу или ее антигенсвязывающие фрагменты (см., *например*, *Medical Applications of Controlled Release*, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Fla. (1974); *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance*, Smolen and Ball (eds.), Wiley, N.Y. (1984); Ranger and Peppas, J., *Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.*, 23:61, 1983; см. также Levy et al., *Science*, 228:190, 1985; During et al., *Ann. Neurol.*, 25:351, 1989; Howard et al., *J. Neurosurg.*, 71:105, 1989); патент США № 5,679,377; патент США № 5,916,597; патент США № 5,912,015; патент США № 5,989,463; патент США № 5,128,326; публикацию PCT № WO 99/15154; а также публикацию PCT № WO 99/20253). В еще одном варианте осуществления система с контролируемым высвобождением может быть размещена в непосредственной близости от терапевтической мишени (*например*, пораженного сустава), что требует лишь части системной дозы (см., *например*, Goodson, in *Medical Applications of Controlled Release*, *выше*, vol. 2, pp. 115-138 (1984)). Другие системы с контролируемым высвобождением описаны в обзоре Langer, *Science*, 249:1527-1533, 1990.

[00152] Кроме того, гAAV можно применять для доставки трансгенов *in vivo* в научных исследованиях, таких как оптогенетика, нокдаун генов с помощью miРНК, доставка рекомбиназы для условной делеции генов, редактирование генов с помощью CRISPR и т.п.

5.5. Фармацевтические композиции и наборы

[00153] В настоящем изобретении дополнительно предлагается фармацевтическая композиция, включающая фармацевтически приемлемый носитель и агент по настоящему изобретению, при этом указанный агент содержит молекулу гAAV по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит гAAV в сочетании с фармацевтически приемлемым носителем для введения субъекту. В одном варианте осуществления термин «фармацевтически приемлемый» обозначает одобренный регуляторным ведомством Федерального правительства или правительством штата, или приведенный в Фармакопее США или другой общепризнанной фармакопее для применения для животных, а более конкретно для человека. Термин «носитель» относится к разбавителю, адъюванту (*например*, полному и неполному адъюванту Фрейнда), вспомогательному веществу или несущей среде, с которыми вводят

агент. Такие фармацевтические носители могут быть стерильными жидкостями, такими как вода и масла, включая масла нефтяного, животного, растительного или синтетического происхождения, в том числе, *например*, арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и т.п. Вода является типовым носителем при внутривенном введении фармацевтической композиции. В качестве жидких носителей, в частности, для растворов для инъекций также можно применять солевые растворы и водные растворы декстрозы и глицерина. Пригодные фармацевтические вспомогательные вещества включают крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, мел, силикагель, стеарат натрия, моностеарат глицерин, тальк, хлорид натрия, сухое обезжиренное молоко, глицерин, пропиленгликоль, воду, этанол и т. п. Дополнительные примеры фармацевтически приемлемых носителей, вспомогательных веществ и стабилизаторов включают, помимо прочего, буферы, такие как фосфатный, цитратный и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту; низкомолекулярные полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин и желатин; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие агенты, такие как EDTA; сахарные спирты, такие как маннит или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; и/или неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как TWEENTM, полиэтиленгликоль (PEG) и PLURONICSTM, известные в данной области техники. Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может также включать лубрикант, смачивающий агент, подсластитель, ароматизатор, эмульгатор, суспендирующий агент и консервант в дополнение к вышеуказанным ингредиентам. Данные композиции могут находиться в форме растворов, суспензий, эмульсий, таблеток, пилюль, капсул, порошков, составов с замедленным высвобождением и т.п.

[00154] В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения предлагаются фармацевтические композиции для применения в соответствии со способами по настоящему изобретению, причем указанные фармацевтические композиции содержат терапевтически и/или профилактически эффективное количество агента по настоящему изобретению вместе с фармацевтически приемлемым носителем.

[00155] В определенных вариантах осуществления агент по настоящему изобретению является по существу очищенным (*т.е.* по существу не содержит веществ, которые ограничивают его действие или вызывают нежелательные побочные эффекты). В конкретном варианте осуществления хозяин или субъект представляет собой животное, *например*, млекопитающее, такое как неприматы (*например*, коровы, свиньи, лошади,

кошки, собаки, крысы и т. д.) и приматы (*например*, обезьяны, такие как обезьяна *супомолгус*, а также человек). В определенном варианте осуществления субъектом является человек.

[00156] В настоящем изобретении дополнительно предлагаются наборы, которые можно применять в вышеуказанных способах. В одном варианте осуществления набор содержит одно или несколько средств по изобретению, *например*, в одном или большем количестве контейнеров. В другом варианте осуществления набор дополнительно содержит одно или большее количество других профилактических или терапевтических агентов, пригодных для лечения патологического состояния, в одном или большем количестве контейнеров.

[00157] В изобретении также предлагаются агенты по настоящему изобретению, упакованные в герметичный контейнер, такой как ампула или саше, с указанием количества агента или активного агента. В одном варианте осуществления указанный агент поставляется в виде сухого стерилизованного лиофилизированного порошка или безводного концентрата в герметично закрытом контейнере и может быть восстановлен, *например*, водой или солевым раствором до подходящей концентрации для введения субъекту. Обычно указанный агент поставляется в виде сухого стерильного лиофилизированного порошка в герметично закрытом контейнере в разовой дозе по меньшей мере 5 мг, чаще по меньшей мере 10 мг, по меньшей мере 15 мг, по меньшей мере 25 мг, по меньшей мере 35 мг, по меньшей мере 45 мг, по меньшей мере 50 мг или по меньшей мере 75 мг. Лиофилизированный агент следует хранить при температуре от 2 до 8°C в оригинальном контейнере, и агент следует ввести в течение 12 часов, обычно в течение 6 часов, в течение 5 часов, в течение 3 часов или в течение 1 часа после восстановления. В альтернативном варианте осуществления агент по настоящему изобретению поставляется в жидкой форме в герметично закрытом контейнере с указанием количества и концентрации агента или активного агента. Обычно жидкая форма указанного агента поставляется в герметично закрытом контейнере по меньшей мере 1 мг/мл, по меньшей мере 2,5 мг/мл, по меньшей мере 5 мг/мл, по меньшей мере 8 мг/мл, по меньшей мере 10 мг/мл, по меньшей мере 15 мг/кг или по меньшей мере 25 мг/мл.

[00158] Композиции по настоящему изобретению включают нерасфасованные лекарственные композиции, применяемые при изготовлении фармацевтических композиций (*например*, неочищенные или нестерильные композиции), а также фармацевтические композиции (т.е. композиции, пригодные для введения субъекту или пациенту). Нерасфасованные лекарственные композиции можно применять при приготовлении стандартных лекарственных форм, *например*, содержащих профилактически или терапевтически эффективное количество агента, описанного в

данном документе, или комбинации этих агентов и фармацевтически приемлемого носителя.

[00159] В настоящем изобретении также предлагается фармацевтическая упаковка или набор, содержащий один или большее количество контейнеров, наполненных одним или большим количеством агентов по настоящему изобретению. Кроме того, в фармацевтическую упаковку или набор также могут быть включены одно или большее количество других профилактических или терапевтических агентов, пригодных для лечения целевого заболевания или нарушения. В настоящем изобретении также предлагается фармацевтическая упаковка или набор, содержащие один или большее количество контейнеров, заполненных одним или большим количеством ингредиентов фармацевтической композиции по настоящему изобретению. С таким контейнером(ами) необязательно может быть связано уведомление в форме, предписанной правительственным агентством, регулирующим изготовление, применение или продажу фармацевтических или биологических продуктов, причем указанное уведомление отражает одобрение агентства по изготовлению, применению или продаже для введения человеку.

[00160] Как правило, ингредиенты композиций по настоящему изобретению поставляются либо по отдельности, либо смешиваются друг с другом в стандартной лекарственной форме, например, в виде сухого лиофилизированного порошка или безводного концентрата в герметично закрытом контейнере, таком как ампула или саше, с указанием количества агента или активного агента. Когда предполагается введение композиции путем инфузии, ее можно наливать во флакон для инфузий, содержащий воду или солевой раствор фармацевтической степени чистоты. Когда композицию вводят путем инъекции, то может прилагаться ампула стерильной воды для инъекций или солевой раствор, чтобы ингредиенты можно было смешивать перед введением.

6. ПРИМЕРЫ

[00161] В следующих примерах сообщается об анализе экспонированных на поверхности петель капсида AAV9 для выявления кандидатов на инженерию капсида посредством инсерционного мутагенеза. Дополнительные примеры демонстрируют повышенную трансдукцию и тропизм к тканям для различных описанных в данном документе капсидов AAV.

6.1. Пример 1 – Анализ капсида AAV9

[00162] Фиг. 1 и 2 иллюстрируют анализ четвертой вариабельной области аденоассоциированного вируса типа 9 (AAV9 VR-IV) путем сравнения аминокислотной

последовательности с другими AAV VR-IV (**Фиг. 1**) и белковой моделью (**Фиг. 2**). Как видно, AAV9 VR-IV экспонируется на поверхности на кончике или внешней поверхности тройного шипа. Дальнейший анализ показал, что существует мало взаимодействий боковых цепей между VR-IV и VR-V и что последовательность и структура VR-IV являются переменными среди серотипов AAV, и, кроме того, существует потенциал для прерывания эпитопа обычно целевого нейтрализующего антитела и, таким образом, снижения иммуногенности модифицированного капсида.

6.2. Пример 2 – Конструирование мутантов AAV9

[00163] Было сконструировано восемь мутантов AAV9, каждый из которых включал гетерологичный пептид, но в разных точках вставки в петле VR-IV. Гетерологичный пептид представлял собой метку FLAG, которую вставляли сразу после следующих остатков в векторах, идентифицированных как pRGNX1090-1097, как показано в **Таблице 1**.

Таблица 1

Обозначение вектора	AAV9 VR-IV Сайт вставки тега FLAG
pRGNX1090	I451
pRGNX1091	N452
pRGNX1092	G453
pRGNX1093	S454
pRGNX1094	G455
pRGNX1095	Q456
pRGNX1096	N457
pRGNX1097	Q458

6.3. Пример 3 – Анализ эффективности упаковки

[00164] **Фиг. 3** демонстрирует высокую эффективность упаковки в контексте количества копий генома на мл (GC/мл) AAV9 дикого типа и восьми (8) векторов-кандидатов gAAV9 (1090, 1091, 1092, 1093, 1094, 1095, 1096 и 1097), при этом каждый из векторов-кандидатов содержит вставку FLAG на разных сайтах в пределах AAV9 VR-IV. Все векторы были упакованы с трансгеном люциферазы в 10 мл культуры, чтобы облегчить определение того, какие точки вставки не прерывали упаковку капсида; планки погрешностей представляют собой стандартную ошибку среднего значения.

[00165] Как видно, все упаковки-кандидаты обладают высокой эффективностью.

6.4. Пример 4 – Анализ экспозиции вставок FLAG на поверхности

[00166] Фиг. 4 демонстрирует экспозицию на поверхности вставок FLAG в каждом из восьми (8) векторов-кандидатов гAAV9 (1090, 1091, 1092, 1093, 1094, 1095, 1096 и 1097), подтвержденные иммунопреципитацией трансдуцированных векторов путем связывания со смолой анти-FLAG. Связывание с анти-FLAG указывает на точки вставки, которые позволяют формировать капсиды, которые отображают вставку пептида на поверхности.

[00167] Трансдуцированные клетки лизировали и центрифугировали. 500 мкл супернатанта клеточной культуры наносили на 20 мкл гранул агарозы-FLAG и элюировали загрузочным буфером SDS-PAGE, который также загружали непосредственно на гель. В качестве отрицательного контроля применяли супернатант 293-ssc, который не содержал вставок FLAG.

[00168] Как видно, 1090 имел самый низкий титр среди векторов-кандидатов, что указывает на наименьшее количество белка, опущенного вниз. Очень низкие титры также наблюдались в положительном контроле. Вполне вероятно, что было загружено недостаточное количество положительного контроля для визуализации в SDS-PAGE.

6.5. Пример 5 – Анализ эффективности трансдукции

[00169] На Фиг. 5A-5B изображена эффективность трансдукции в клетках Lec2, трансдуцированных капсидными векторами, несущими ген люциферазы (в виде трансгена), который был упакован либо в AAV9 дикого типа (9-luc), либо в каждый из восьми (8) векторов-кандидатов гAAV9 (1090, 1091, 1092, 1093, 1094, 1095, 1096 и 1097); активность выражается в процентах активности люциферазы, принимая активность 9-luc за 100% (Фиг. 5A), или в относительных световых единицах (RLU) на микрограмм белка (Фиг. 5B).

[00170] Клетки Lec2, полученные из CHO, выращивали в α MEM и 10% FBS. Клетки Lec2 трансдуцировали при значении MOI около 2×10^8 GC вектора (MOI около 10 000) и обрабатывали реагентом ViraDuctin (аналогичные результаты наблюдались при трансдукции клеток Lec2 при значении MOI около 10 000 GC/клетку, но обрабатывали 40 мкг/мл хлорида цинка ($ZnCl_2$); результаты не показаны). Клетки Lec2 являются ауксотрофами пролина из CHO.

[00171] Как видно, эффективность трансдукции *in vitro* ниже, чем при применении AAV9 дикого типа (9-luc). Тем не менее, предыдущие исследования показали, что введение хоуминг-пептида может снижать перенос генов *in vitro* в клетки, не являющиеся мишенями (например, 293, Lec2 или HeLa), при этом значительно увеличивая перенос генов *in vitro* в клетки-мишени (см., например, Nicklin *et al.* 2001; and Grifman *et al.* 2001).

6.6. Пример 6 – Анализ эффективности упаковки как фактора состава и длины

вставочного пептида

[00172] Фиг. 6А демонстрирует гистограмму, демонстрирующую, что вставки пептида непосредственно после S454 капсида AAV9 (SEQ ID NO:67) различной длины и состава могут влиять на эффективность продуцирования частиц AAV в линии упаковочных клеток. Десять пептидов разного состава и длины были вставлены после S454 (между остатками 454 и 455) в AAV9 VR-IV. qPCR проводили на собранном супернатанте трансфицированных суспензионных клеток HEK293 через пять дней после трансфекции. Результаты, представленные на гистограмме, демонстрируют, что природа и длина вставок могут влиять на способность частиц AAV продуцироваться с высоким титром и упаковываться в клетки 293. (Планки погрешностей представляют собой стандартную ошибку средней длины пептида, которая указана на оси Y в скобках.)

[00173] Исследовали векторы AAV9, имеющие капсидный белок, содержащий самонаводящийся пептид следующих пептидных последовательностей (Таблица 2) в сайте вставки S454. Адаптированные к суспензии клетки HEK293 высевали в количестве 1×10^6 клеток/мл за один день до трансдукции в 10 мл среды. Трансфекцию тройной плазмидной ДНК проводили с помощью PEIpro® (трансфекция Polypus) при соотношении ДНК:PEI 1:1,75. Клетки центрифугировали и супернатант собирали через пять дней после трансфекции и хранили при -80 °C.

Таблица 2.

Пептид#	Обозначение ткани или мишени	Пептидная последовательность	SEQ ID NO:
P1	Bone1 (D8)	DDDDDDDD	2
P2	Brain1	LSSRLDA	3
P3	Brain2	CLSSRLDAC	4
P4	Kidney1	LPVAS	6
P5	Kidney2	CLPVASC	5
P6	Muscle1	ASSLNIA	7
P7	TfR1	HAIYPRH	10
P8	TfR2	THRPPMWSPVWP	11
P9	TfR3	RTIGPSV	12
P10	TfR4	CRTIGPSVC	13

[00174] qPCR проводили на собранном супернатанте трансфицированных суспензионных клеток HEK293 через пять дней после трансфекции. Образцы подвергали обработке ДНКазой I для удаления остаточной плазмидной или клеточной ДНК, а затем термообработке для инактивации ДНКазы I и денатурации капсидов. Образцы титровали с помощью qPCR с использованием TaqMan Universal PCR Master Mix, No AmpEraseUNG (ThermoFisherScientific) и праймера/зонда против последовательности полиА, упакованной в трансгенную конструкцию. Стандартные кривые строили с использованием вектора RGX-501 BDS.

[00175] Пептидные вставки непосредственно после S454 длиной от 5 до 10 аминокислот приводили к образованию AAV частиц с адекватным титром, в то время как верхний предел размера возможен, при этом значительные недостатки упаковки наблюдаются для пептидной вставки длиной 12 аминокислот.

6.7. Пример 7 - Хоуминг-пептиды изменяют свойства трансдукции AAV9 *in vitro* при вставке после S454.

[00176] На Фиг. 6В-Е представлены флуоресцентные изображения клеточных культур (Фиг. 6В) линии клеток Lec2 (линия эпителиальных клеток с дефицитом сиаловой кислоты), (Фиг. 6С) линии клеток HT-22 (линия нейронных клеток), (Фиг. 6D) линии клеток hCMEC/D3 (линия эндотелиальных клеток головного мозга) и (Фиг. 6Е) линии клеток C2C12 (линия мышечных клеток). Для трансдукции указанных клеточных линий применяли капсиды AAV9 дикого типа и капсиды хоуминг-пептида со вставкой S454 из Таблицы 2, содержащие трансген GFP.

[00177] Клеточные линии высевали в количестве $5-20 \times 10^3$ клеток/лунку (в зависимости от клеточной линии) в 96-луночные планшеты за 24 часа до трансдукции. Клетки трансдуцировали векторами AAV9-GFP (со вставками или без них) в количестве 1×10^{10} частиц/лунку и анализировали с помощью Cytation5 (BioTek) через 48-96 часов после трансдукции, в зависимости от различий в скорости экспрессии в каждой клеточной линии. Клетки Lec2 культивировали, как в Примере 5, клетки гематоэнцефалического барьера hCMEC/D3 (EMD Millipore) культивировали в соответствии с протоколом производителя, клетки HT-22 и HUH7 культивировали в DMEM и 10% FBS, а миобласты C2C12 высевали в DMEM и 10% FBS и дифференцировали в течение трех дней до трансфекции в среде DMEM с добавлением 2% лошадиной сыворотки и 0,1% инсулина. AAV9.S454.FLAG продемонстрировал низкие уровни трансдукции в каждом протестированном типе клеток.

[00178] Изображения демонстрируют, что хоуминг-пептиды могут изменять свойства трансдукции AAV9 *in vitro* при вставке после S454 в капсидный белок AAV9 по сравнению

с немодифицированным капсидом AAV9. P7 (пептид TfR1, HAIYPRH (SEQ ID NO:10)) для всех клеточных линий демонстрирует самую высокую скорость трансдукции, после которого следует P9 (пептид TfR3, RTIGPSV (SEQ ID NO:12)). P4 (пептид Kidney1, LPVAS (SEQ ID NO:6)) продемонстрировал несколько более высокую скорость трансдукции, чем AAV9 дикого типа для всех типов клеток. Более высокие скорости трансдукции наблюдались для P6 (пептид Muscle1, ASSLNIA (SEQ ID NO:7)) в культурах эндотелиальных клеток головного мозга hCMEC/D3 и культурах мышечных клеток C2C12 по сравнению с культурами клеточных линий Lec2 и HT-22. Вектор P1 не был включен в изображения из-за чрезвычайно низкой эффективности трансдукции, а вектор P8 не был включен из-за низкого титра.

6.8. Пример 8 – Анализ капсидов AAV на точки вставки пептидов

[00179] **Фиг. 7** демонстрирует выравнивание последовательностей AAVs 1-9e, 3B, rh10, rh20, rh39, rh73, rh74 версии 1 и версии 2, hu12, hu21, hu26, hu37, hu51 и hu53 в пределах сайтов вставки для пептидов, которые усиливают тропизм ткани глаза в пределах или рядом с кодоном инициации VP2, варибельной области 1 (VR-I), варибельной области 4 (VR-IV) и варибельной области 8 (VR-VIII), выделенных серым цветом; конкретный сайт вставки в восьмой варибельной области (VR-VIII) каждого капсидного белка обозначен символом «#» (после аминокислотного остатка 588 в соответствии с нумерацией аминокислот AAV9).

6.9. Пример 9 – Сравнение копий генома AAV/мкг геномной ДНК различных векторов

[00180] **Фиг. 8** изображает копии трансгена GFP (зеленый флуоресцентный белок), экспрессированного в клетках головного мозга мыши после введения векторов AAV: AAV9; AAV.PHP.eB; AAV.hDyn (AAV9 с TLAAPFK (SEQ ID NO:1) между 588-589 без других аминокислотных модификаций капсидной последовательности); AAV.PHP.S; и AAV.PHP.SH (см. **Таблицу 10**).

[00181] AAV.PHP.B представляет собой капсид со вставкой TLAVPFK (SEQ ID NO:20) в капсиде AAV9 без каких-либо других аминокислотных модификаций в капсидной последовательности. AAV.PHP.eB представляет собой капсид, содержащий вставку TLAVPFK (SEQ ID NO:20) в капсиде AAV9, с двумя аминокислотными модификациями капсидной последовательности выше вставки PHP.B (см. также **Таблицу 10**). В **Таблице 3А** обобщены капсиды, использованные в исследовании.

Таблица 3А

Название	Родительский капсид	Мутация	Место вставки 2	Пептид 2	SEQ ID NO:
AAV9	AAV9	-	-	-	
PHP.B	AAV9	-	588_589	TLAVPFK	20
PHP.eB	AAV9	586A_587Q delinsDG	588_589	TLAVPFK	20
AAV.hDyn	AAV9	-	588_589	TLAAPFK	1
AAV.PHP.S	AAV9	-	588_589	QAVRTSL	16
AAV.PHP.S Н	AAV9	-	588_589	QAVRTS Н	17

Материалы и способы

[00182] Конструкции AAV9, AAV.PHPeB, AAV.hDyn, AAV.PHP.S and AAV.PHP.SH , кодирующие трансген GFP, были приготовлены и составлены в 1xPBS + 0,001% Pluronic. Самок мышей C57BL/6 рандомизировали в группы лечения в зависимости от массы тела в День 1. Каждой из пяти групп самок мышей C57BL/6 внутривенно вводили AAV9.GFP, AAV.PHPeB.GFP, AAV.hDyn.GFP, AAV.PHP.S.GFP или AAV.PHP.SH.GFP в соответствии с **Таблицей 3В** ниже. Объем дозы составлял 10 мл/кг (0,200 мл/20 г мыши). Мыши были в возрасте 8-12 недель на дату начала лечения. На день 15 после введения животных подвергали эвтаназии и собирали периферические ткани, включая мозговую ткань, печень, бицепсы передних конечностей, сердце, почки, легкие, яичники и седалищный нерв.

Таблица 3В.

Группа	N	Агент	Доза фармацевтического состава	Путь введения	Схема введения
1	9	AAV9	2,5E12 GC/кг	в/в	день 1
2	5	PHPeB	2,5E12 GC/кг	в/в	день 1
3	5	hDyn	2,5E12 GC/кг	в/в	день 1
4	5	PHP.S	2,5E12 GC/кг	в/в	день 1
5	5	PHP.SH	2,5E12 GC/кг	в/в	день 1

[00183] Количественную PCR (qPCR) применяли для определения количества векторных

геномов на мкг геномной ДНК головного мозга. Образцы головного мозга от инъектированных мышей обрабатывали и выделяли геномную ДНК с помощью набора Blood and Tissue Genomic DNA от компании Qiagen. Анализ qPCR проводили на приборе QuantStudio 5 (Life Technologies Inc) с применением комбинации праймер-зонд, специфичной для eGFP, по методу стандартной кривой.

[00184] Количество копий генома вектора AAV на мкг геномной ДНК головного мозга было по меньшей мере на логарифм выше у мышей, которым вводили AAV.hDyn, по сравнению со всеми другими серотипами AAV: AAV9, AAV.PHPeB, PHP.S и PHP.SH (см. **Фиг. 8**). Как видно из этого исследования, GC/мкг геномной ДНК является самым высоким для AAV.hDyn, который представляет собой капсид AAV9, содержащий пептидную вставку «TLAAPFK» (SEQ ID NO:1) (пептид из аксонемального динеина человека) между остатками 588–589 капсида AAV9. Это исследование продемонстрировало трансдукцию в головном мозге мышей при более чем 1E04 GC/мкг трансгена в среднем у 5 мышей, которым системно вводили AAV.hDyn, несущих eGFP. Однако другие модифицированные капсиды AAV9, включая вектор AAV.PHPeB, который содержит последовательность «TLAVPFK» (SEQ ID NO:20) (пептид мышинового динеина), продемонстрировал трансдукцию в головном мозге мышей при менее чем 1E03 GC/мкг трансгена при системном введении.

6.10. Пример 9 – Конструирование капсида rAAV, содержащего LALGETTRPA (SEQ ID NO:9)

[00185] Фиг. 9А изображает аминокислотную последовательность капсида рекомбинантного вектора AAV3B, включающую пептидную вставку аминокислотной последовательности LALGETTRP (SEQ ID NO:9) между N588 и T589 области VR-III. Вставленный пептид выделен жирным шрифтом.

[00186] Фиг. 9В изображает аминокислотную последовательность капсида рекомбинантного вектора AAV3B, включающую пептидную вставку аминокислотной последовательности LALGETTRP (SEQ ID NO:9) между S267 и S268 области VR-III. Вставленный пептид выделен жирным шрифтом.

[00187] Фиг. 9С изображает аминокислотную последовательность капсида рекомбинантного вектора AAV3B, включающую пептидную вставку аминокислотной последовательности LALGETTRP (SEQ ID NO:9) между G454 и T455 области VR-IV. Вставленный пептид выделен жирным шрифтом.

6.11. Пример 10 – Конструирование капсида rAAV, содержащего LALGETTRPA

(SEQ ID NO:9)

[00188] Фиг. 10А изображает аминокислотную последовательность капсида рекомбинантного вектора AAVrh73, включающую пептидную вставку аминокислотной последовательности LALGETTRP (SEQ ID NO:9) между N590 и T591 области VR-III. Вставленный пептид выделен жирным шрифтом.

[00189] Фиг. 10В изображает аминокислотную последовательность капсида рекомбинантного вектора AAVrh73, включающую пептидную вставку аминокислотной последовательности между T270 и N271 области VR-III. Вставленный пептид выделен жирным шрифтом.

[00190] Фиг. 10С изображает аминокислотную последовательность капсида рекомбинантного вектора AAVrh73, включающую пептидную вставку аминокислотной последовательности LALGETTRPA (SEQ ID NO:9) между G456 и G457 области VR-IV. Вставленный пептид выделен жирным шрифтом.

6.12. Пример 11 – Конструирование капсида rAAV, содержащего LALGETTRPA (SEQ ID NO:9)

[00191] Фиг. 11А изображает аминокислотную последовательность капсида рекомбинантного вектора AAV8, включающую пептидную вставку аминокислотной последовательности LALGETTRP (SEQ ID NO:9) между N590 и T591 области VR-VIII. Вставленный пептид выделен жирным шрифтом.

[00192] Фиг. 11В изображает аминокислотную последовательность капсида рекомбинантного вектора AAV8, включающую пептидную вставку аминокислотной последовательности LALGETTRP (SEQ ID NO:9) между A269 и T270 области VR-III. Вставленный пептид выделен жирным шрифтом.

[00193] Фиг. 11С изображает аминокислотную последовательность капсида рекомбинантного вектора AAV8, включающую пептидную вставку аминокислотной последовательности LALGETTRP (SEQ ID NO:9) между T453 и T454 области VR-IV. Вставленный пептид выделен жирным шрифтом.

6.13. Пример 12 – *In vitro* тестирование трансдукции при проникновении через гематоэнцефалический барьер

[00194] Способность модифицированных капсидов преодолевать гематоэнцефалический барьер тестировали в transwell анализе *in vitro* с применением клеток hCMEC/D3 BBB (SCC066, Millipore-Sigma) (см. **Фиг. 12А-12В**). Более конкретно, анализ был по существу

адаптирован из Sade, H. *et al.* (2014 PLoS ONE 9(4): e96340) A human Blood-Brain Barrier transcytosis assay reveals Antibody Transcytosis influenced by pH-dependent Receptor Binding, April 2014, Vol. 9, Issue 4; и Zhang, X., Blood-brain barrier shuttle peptides enhance AAV transduction in the brain after systemic administration, 2018 *Biomaterials* 176: 71–83. Вкратце, 5×10^4 hCMEC/D3 клеток/см² высевали в покрытые коллагеном вставки Transwell в 12-луночной планшете. Каждая вставка содержала 500 мкл среды, а нижняя камера содержала 1 мл среды. Среду меняли каждый второй день. Супернатант удаляли через 10 дней после посева (нулевой (0) момент времени). В этот 0-й момент времени клетки трансдуцировали путем добавления 1×10^9 GC вектора в среду верхней вставной камеры. 10 мкл образцов супернатанта из нижней камеры отбирали для тестирования с интервалами 0,5, 3, 6 и 23 часа после трансдукции. Каждое состояние (вектор) тестировали в двух повторностях и измеряли титр с помощью qPCR против полиА в трех повторностях.

[00195] На **Фиг. 12А-12В** изображен transwell анализ *in vitro* для AAV.hDyn (AAV9 с TLAAPFK (SEQ ID NO:1) между аминокислотными остатками 588-589), пересекающего клеточный слой гематоэнцефалического барьера (BBB) (**Фиг. 12А**), и результаты, демонстрирующие, что AAV.hDyn (обозначен перевернутыми треугольниками на фигуре) проникает через слой клеток BBB в анализе быстрее, чем AAV9 (квадраты), а также быстрее и в большей степени, чем AAV2 (кружки) (**Фиг. 12В**). Разработанный анализ *in vitro* спрогнозировал усиленное проникновение через BBB, и аналогичные анализы можно применять для прогнозирования нацеливания на другие органы.

6.14. Пример 13 – Трансдукция и биораспределение модифицированных капсидов

6.14.1 Материалы и способы

[00196] Капсидные модификации были выполнены на широко применяемых капсидах AAV, включая AAV8, AAV9 и AAVrh.10, путем вставки различных пептидных последовательностей после положения S454 области VR-IV (**Таблица 4**) или после положения Q588 экспонированной на поверхности петли области VR-VIII капсида AAV, а также вставки после иницирующего кодона VP2, который начинается с аминокислоты 137 (AAV4, AAV4-4 и AAV5) или с аминокислоты 138 (AAV1, AAV2, AAV3, AAV3-3, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV9e, rh.10, rh.20, rh.39, rh.74 и hu.37) (**Фиг. 7**) (см. **Таблица 10** для определенных капсидных последовательностей). Отобранные мутации одной или множества аминокислот также применяли для модификации капсидов. См. также Yost *et al.*, Structure-guided engineering of surface exposed loops on AAV Capsids. 2019. ASGCT Annual Meeting; и Wu *et al.*, 2000 *J. Virology* (*выше*). Было подтверждено, что никакая из

этих модификаций капсида в небольших масштабах не оказала негативного влияния на эффективность упаковки.

[00197] rAAV с определенными модифицированными капсидами тестировали на трансдукцию *in vitro* в клетках Lec2, как описано выше в Примере 5. Следующие модифицированные AAV тестировали на трансдукцию в клетках Lec2: eB 588 Ad, eB 588 Hep, eB 588 p79, eB 588 Rab, AAV9 588 Ad, AAV9 588 Hep, AAV9 588 p79, AAV9 588 Rab, eB VP2 Ad, eB VP2 Hep, eB VP2 p79, eB VP2 Rab, AAV9 VP2 Ad, AAV9 VP2 Hep, AAV9 VP2 p79, AAV9 VP2 Rab по сравнению с AAV9. См. **Таблицу 4В** ниже для идентификации капсидов AAV.

[00198] Для тестирования биораспределения модифицированные AAV были упакованы с кассетой трансгена eGFP, содержащей специфические коды, соответствующие каждому отдельному капсиду. Новые штрих-кодированные векторы объединяли и вводили мышам для повышения эффективности скрининга.

[00199] Для анализа биораспределения генетически измененных векторов AAV, были приготовлены различные векторы, кодирующие GFP, и составлены в 1xPBS + 0,0001% плюроновой кислоты. Все векторы были изготовлены с цис-плазмидами, содержащими код из десяти (10) п.н., чтобы обеспечить возможность подготовки библиотеки (пула) для секвенирования следующего поколения (NGS). Три (3) пула векторов (векторы Исследование 1, Исследование 2 и Исследование 3) вводили внутривенно группе из 5 самок мышей C57Bl/6 в соответствии с **Таблицами 4А-С**. Объем дозы составлял 10 мл/кг (0,2 мл/20 г мыши) для каждой мыши.

[00200] Мыши были рандомизированы в группы лечения в зависимости от массы тела в День 1, и их возраст на дату начала лечения составлял 8-12 недель. На день 15 после введения животных подвергали эвтаназии и собирали периферические ткани, включая мозг, почки, печень, седалищный нерв, легкие, сердце и мышечную ткань. В исследованиях, в которых выбранные капсиды из пула вводили индивидуально, следовали одному и тому же протоколу.

[00201] Геномную ДНК (gDNA) выделяли из образцов тканей с помощью набора DNeasy Blood and Tissue (69506) от компании Qiagen. Область кода каждого вектора была амплифицирована с помощью праймеров, содержащих перекрытия для стратегии NGS, уникального двойного индексирования (UDI), а также мультиплексного секвенирования в соответствии с рекомендациями производителя (Illumina). Illumina MiSeq с nano и micro наборами реагентов v2 (MS-103-1001/1002) применяли для определения относительного содержания каждого штрих-кодированного вектора AAV в образце, взятом у мышей. Соответственно, каждый образец вектора в **Таблицах 4А-С** ниже был штрих-

кодированным, как указано выше, чтобы обеспечить идентификацию и сортировку каждого считывания перед окончательным анализом данных. Данные были нормализованы на основе состава AAV в первоначально введенном пуле и количественно оценены с учетом общего количества копий генома, полученного из анализа qPCR с комбинацией праймер-зонд, специфичной для штрих-кодированного образца.

Таблица 4А

Исследование 1	Название	Капсид	Точка вставки	Пептид	Примечания
BC01	AAV9	AAV9	-	-	
BC02	PHP.eB	PHP.eB	588_589	TLAVPFK (SEQ ID NO:20)	
BC03	AAV8.BBB	Модифицированный AAV8	-	-	A269S
BC04	AAV9.BBB	Модифицированный AAV9	-	-	S263G/S269T/A273T
BC05	AAV8.BBB.LD	Модифицированный AAV8	-	-	A269S, 498-NNN/AAA-500
BC06	AAV9.BBB.LD	Модифицированный AAV9	-	-	S263G/S269T/A273T, 496-NNN/AAA-498
BC07	rh.10	rh.10	-	-	
BC08	rh.10.LD	Модифицированный rh.10	-	-	498-NNN/AAA-500
BC09	AAV.hDyn	modifiedAAV9	588_589	TLAAPFK (SEQ ID NO:1)	
BC10	PHP.S	PHP.S	588_589	QAVRTSL (SEQ ID NO:163)	-
BC11	PHP.SH	PHP.SH	588_589	QAVRTSH (SEQ ID	-

Исследование 1	Название	Капсид	Точка вставки	Пептид	Примечания
				NO:17)	
BC13	rh39	rh.39	-	-	-

Таблица 4В

Исслед. 2	Название	Капсид	Точка вставки	Пептид	Примечания
BC20	eB 588 Ad	PHP.eB	588_589	SITLVKSTQTV (SEQ ID NO:14)	Заменяет пептид TLAVPFK (SEQ ID NO:20)
BC21	eB 588 Hep	PHP.eB	588_589	TILSRSTQTG (SEQ ID NO:15)	Заменяет пептид TLAVPFK (SEQ ID NO:20)
BC22	eB 588 p79	PHP.eB	588_589	VVMVGEKPITITQ HSVETEG (SEQ ID NO:18)	Заменяет пептид TLAVPFK (SEQ ID NO:20)
BC23	eB 588 Rab	PHP.eB	588_589	RSSEEDKSTQTT (SEQ ID NO:19)	Заменяет пептид TLAVPFK (SEQ ID NO:20)
BC24	9 588 Ad	AAV9	588_589	SITLVKSTQTV (SEQ ID NO:14)	
BC25	9 588 Hep	AAV9	588_589	TILSRSTQTG (SEQ ID NO:15)	
BC26	9 588 p79	AAV9	588_589	VVMVGEKPITITQ HSVETEG (SEQ ID NO:18)	
BC27	9 588 Rab	AAV9	588_589	RSSEEDKSTQTT (SEQ ID NO:19)	
BC28	eB VP2 Ad	PHP.eB	138_139	SITLVKSTQTV (SEQ ID NO:14)	Также имеет вставку TLAVPFK (SEQ ID NO: 20)

Исслед. 2	Название	Капсид	Точка вставки	Пептид	Примечания
					после остатка 588.
BC29	eB VP2 Hep	PHP.eB	138_139	TILSRSTQTG (SEQ ID NO:15)	Также имеет вставку TLAVPFK (SEQ ID NO: 20) после остатка 588.
BC30	eB VP2 p79	PHP.eB	138_139	VVMVGEKPITITQ HSVETEG (SEQ ID NO:18)	Также имеет вставку TLAVPFK (SEQ ID NO: 20) после остатка 588.
BC31	AAV9	AAV9	-	-	
BC32	eB VP2 Rab	PHP.eB	138_139	RSSEEDKSTQTT (SEQ ID NO:19)	Также имеет вставку TLAVPFK (SEQ ID NO: 20) после остатка 588.
BC33	9 VP2 Ad	AAV9	138_139	SITLVKSTQTV (SEQ ID NO:14)	
BC34	9 VP2 Hep	AAV9	138_139	TILSRSTQTG (SEQ ID NO:15)	
BC35	9 VP2 p79	AAV9	138_139	VVMVGEKPITITQ HSVETEG (SEQ ID NO:18)	
BC36	9 VP2 Rab	AAV9	138_139	RSSEEDKSTQTT (SEQ ID NO:19)	

Таблица 4С

Исслед. 3	Название	Капсид	Точка вставки	Пептид	Примечания
BC01	AAV9	AAV9	-	-	
BC03	AAV8-BBB	AAV8	-	-	A269S
BC07	rh10	rh.10	-	-	
BC09	AAV.hDyn	AAV.hDyn	588_589	TLAAPFK	

Исслед. 3	Название	Капсид	Точка вставки	Пептид	Примечания
				(SEQ ID NO:1)	
BC12	PHP.B	PHP.B	588_589	TLAVPFK (SEQ ID NO:20)	
BC20	AAV9 S454- D8	AAV9	454_455	DDDDDDDD (SEQ ID NO:2)	
BC22	AAV9 S454- Brain1	AAV9	454_455	LSSRLDA (SEQ ID NO:3)	
BC23	AAV9 S454- Brian1C	AAV9	454_455	CLSSRLDAC (SEQ ID NO:4)	
BC24	AAV9 S454- Kidney1	AAV9	454_455	LPVAS (SEQ ID NO:6)	
BC25	AAV9 S454- Kidney1C	AAV9	454_455	CLPVASC (SEQ ID NO:5)	
BC26	AAV9 S454- Muscle1	AAV9	454_455	ASSLNIA (SEQ ID NO:7)	
BC27	AAV9 S454- TfR1	AAV9	454_455	HAIYPRH (SEQ ID NO:10)	
BC29	AAV9 S454- TfR3	AAV9	454_455	RTIGPSV (SEQ ID NO:12)	
BC30	AAV9 S454- TfR4	AAV9	454_455	CRTIGPSVC (SEQ ID NO:13)	
BC31	AAV9 S454- FLAG	AAV9	454_455	DYKDDDDK (SEQ ID NO:21)	
BC37	pRGX1005- PHP.eB (no BC)	PHP.eB	588_589	TLAVPFK (SEQ ID NO:20)	

[00202] В исследованиях, в которых отдельные капсиды из пула вводили индивидуально, для определения количества векторных геномов на мкг тканевой геномной ДНК применяли

qPCR. qPCR проводили на приборе QuantStudio 5 (Life Technologies, Inc.) с применением комбинации праймер-зонд, специфичной для eGFP, по методу стандартной кривой (**Фиг. 13**).

[00203] В ходе исследования, в котором отдельные векторы вводили мышам для характеристики, фиксированный формалином головной мозг мыши секционировали на срезы толщиной 40 мкм на микротоме с вибрирующим лезвием (VT1000S, Leica), и плавающие срезы исследовали с применением антител против GFP, чтобы посмотреть на клеточное распределение доставленных векторов.

[00204] Более конкретно, фиксированный головной мозг мышей, которым вводили AAV.hDyn, секционировали на срезы с помощью Vibratome (Leica, VT-1000) и оценивали экспрессию GFP с применением антител против GFP (AB3080, Millipore Sigma), набора Vectastain ABC (PK- 6100, Vector Labs) и набора DAB Peroxidase (SK-4100, Vector Labs). У мышей, которым вводили AAV.hDyn, наблюдалось широкое распределение клеток, экспрессирующих GFP, по всему головному мозгу, включая распределение в коре, стриатуме и гиппокампе головного мозга. **Фиг. 15A-15C** демонстрируют изображения из этих областей, и масштабная линейка составляет 400 мкм (обсуждается ниже).

6.14.2 Результаты

[00205] Результаты приведены на **Фиг. 13**, **Фиг. 14A-14H** и **Фиг. 15A-15C**.

[00206] Данные анализа трансдукции клеток Lec2 не показаны. AAV9 588 Hep (AAV9 с пептидом TILSRSTQTG (SEQ ID NO:15), вставленным после положения 588) проявлял значительно большую трансдукцию (в 4 раза), чем AAV9 дикого типа, и AAV9 VP2 Ad (AAV9 с пептидом SITLVKSTQTV (SEQ ID NO :14), вставленным после положения 138), AAV9 VP2 Hep (AAV9 с пептидом TILSRSTQTG (SEQ ID NO:15), вставленным после положения 138), и AAV9 VP2 Rab (AAV9 с пептидом RSSEEDKSTQTT (SEQ ID NO:19), вставленным после положение 138) демонстрировал несколько большую трансдукцию клеток Lec2 по сравнению с AAV9. Другие проанализированные AAV демонстрировали более низкие уровни трансдукции, чем AAV9.

[00207] **Фиг. 13** изображает результаты анализа гДНК головного мозга с помощью секвенирования следующего поколения (NGS), демонстрирующего относительное содержание (процентный состав) пула капсидов, доставленных в головной мозг мышей после внутривенной инъекции. Данные были нормализованы на основе состава AAV в первоначально введенном пуле и количественно оценены с учетом общего числа копий генома, полученного из анализа qPCR с комбинацией праймер-зонд, специфичной для последовательности eGFP. Продемонстрированные данные взяты из трех разных

экспериментов. Пунктирные линии указывают, какие векторы были объединены вместе. Родительский AAV9 применяли в качестве стандарта и включали в каждый пул. Идентификаторы «BC» указаны в Таблицах 4А, 4В и 4С выше.

[00208] На **Фиг. 14А-14Н** изображен профиль трансдукции AAV.hDyп *in vivo* у самок мышей C57Bl/6, демонстрирующий количество копий/микрограмм gДНК у мышей, не подвергавшихся лечению, или у мышей, которым вводили либо AAV9, либо AAV.hDyп, в головном мозге (**Фиг. 14А**), печени (**Фиг. 14В**), сердце (**Фиг. 14С**), легком (**Фиг. 14D**), почке (**Фиг. 14Е**), скелетной мышце (**Фиг. 14F**), седалищном нерве (**Фиг. 14G**) и в яичнике (**Фиг. 14H**), при этом AAV.hDyп демонстрирует повышенное биораспределение в головном мозге по сравнению с AAV9. Количество копий генома вектора AAV на мкг геномной ДНК головного мозга было по меньшей мере на логарифм выше у мышей, которым вводили AAV.hDyп, по сравнению с родительским вектором AAV9.

[00209] **Фиг. 15А-15С** демонстрирует изображения областей, проанализированных в иммуногистохимическом анализе, описанном выше; масштабная линейка 400 мкм. На **Фиг. 15А-15С** изображено распределение GFP из AAV.hDyп по всему головному мозгу, при этом изображения иммуногистохимического окрашивания срезов головного мозга из полосатого тела (**Фиг. 15А**), гиппокампа (**Фиг. 15В**) и коры (**Фиг. 15С**) выявили глобальную трансдукцию головного мозга модифицированным вектором.

6.14.3 Выводы

[00210] Модификации капсида AAV, выполненные либо путем вставок в экспонированные на поверхности петли областей VR-IV и VR-VIII, либо путем специфических аминокислотных мутаций, не влияли на их эффективность упаковки и были способны продуцировать аналогичные титры в системе продуцирования, описанной в данном документе.

[00211] Внутривенное введение AAV.hDyп мышам приводило к более высокому относительному содержанию вирусного генома и большей трансдукции клеток головного мозга, чем другие протестированные модифицированные векторы AAV и AAV9.

6.15. Пример 14 – Биораспределение пула векторов rAAV у обезьян Synomolgus после IVT инъекции

[00212] Введение, *in vivo* и посмертные наблюдения, а также биораспределение пула рекомбинантных AAV со сконструированными капсидами и трансгеном GFP оценивали после однократной интравитреальной инъекции (IVT) обезьянам Synomolgus (**Таблица 5**). Пул содержал множество капсидов, каждый из которых содержал уникальный

идентификационный штрих-код, позволяющий проводить идентификацию с помощью анализа секвенирования следующего поколения (NGS) после введения обезьянам *Cynomolgus*. Все животные в этом исследовании были наивными в отношении предшествующего лечения. Пул может включать по меньшей мере следующие рекомбинантные AAV, имеющие сконструированные капсиды, перечисленные в **Таблице 5**.

Таблица 5. Рекомбинантные AAV для исследования обезьян *Cynomolgus*

Название	Капсид	Модификация капсида	Место вставки	Пептид	Пептид SEQ ID NO:
AAV8	AAV8	-	-	-	
AAV8.BBB	Модифицированный AAV8	A269S	-	-	
AAV8.BBB.LD	Модифицированный AAV8	A269S, 498-NNN/AAA-500	-	-	
AAV9	AAV9	-	-	-	
AAV9 S454-Brain1	AAV9	-	454_455	LSSRLDA	3
AAV9 S454-Brain1C	AAV9	-	454_455	CLSSRLDAC	4
AAV9 S454-D8	AAV9	-	454_455	DDDDDDDD	2
AAV9 S454-Kidney1	AAV9	-	454_455	LPVAS	6
AAV9 S454-Kidney1C	AAV9	-	454_455	CLPVASC	5
AAV9 S454-Muscle1	AAV9	-	454_455	ASSLNIA	7
AAV9 S454-Tfr1	AAV9	-	454_455	HAIYPRH	10
AAV9 S454-Tfr3	AAV9	-	454_455	RTIGPSV	12

Название	Капсид	Модификация капсида	Место вставки	Пептид	Пептид SEQ ID NO:
AAV9 S454-TfR3C	AAV9	-	454_455	CRTIGPSVC	13
AAV9.496NNN/AAA498	Модифицированный AAV9	498-NNN/AAA-500	-	-	
AAV9.496NNN/AAA498.W503R	Модифицированный AAV9	498-NNN/AAA-500, W503R	-	-	
AAV9.588Ad	AAV9	-	588_589	SITLVKSTQTV	14
AAV9.588Herp	AAV9	-	588_589	TILSRSTQTG	15
AAV9.BBB	Модифицированный AAV9	S263G/S269T/A273T	-	-	
AAV9.BBB.LD	Модифицированный AAV9	S263G/S269T/A273T, 496-NNN/AAA-498	-	-	
AAV9.Q474A	Модифицированный AAV9	Q474A	-	-	
AAV9.W503R	Модифицированный AAV9	W503R	-	-	
AAVPHPeB.VP2Ad	PHPeB	-	138_139	SITLVKSTQTV	14
AAVPHPeB.VP2Herp	PHPeB	-	138_139	TILSRSTQTG	15
PHPeB	AAV9	-	588_589	TLAVPFK	20
PHPeB	Модифицированный	A587D, Q588G	588_589	TLAVPFK	20

Название	Капсид	Модификация капсида	Место вставки	Пептид	Пептид SEQ ID NO:
	PHP.B				
PHP.hB	-	-	-	-	-
PHP.S	AAV9	-	588_589	QAVRTSL	16
PHP.SH	AAV9	-	588_589	QAVRTSH	17
AAV1	AAV1	-	-	-	-
AAV2	AAV2	-	-	-	-
AAV2.7m8	AAV2.7m8				
AAV3B	AAV3B	-	-	-	-
AAV4	AAV4	-	-	-	-
AAV5	AAV5	-	-	-	-
AAV6	AAV6	-	-	-	-
AAV7	AAV7	-	-	-	-
hu.12	hu.12	-	-	-	-
hu.13	hu.13	-	-	-	-
hu.21	hu.21	-	-	-	-
hu.26	hu.26	-	-	-	-
hu.51	hu.51	-	-	-	-
hu.53	hu.53	-	-	-	-
hu.56	hu.56	-	-	-	-
rh.31	rh.31	-	-	-	-
hu.31	hu.31	-	-	-	-
rh.34	rh.34	-	-	-	-

6.15.1 Дизайн исследования

[00213] Использовали трех самок обезьяны *Cynomolgus*. Для оценки биораспределения (измеренного с помощью NGS и PCR), ассоциированного с IVT-инъекцией, собирали соответствующие ткани. Трем животным была выполнена одна интравитреальная инъекция.

[00214] Интравитреальную инъекцию (IVT) выполняли билатерально в виде болюсной инъекции в объеме дозы 50 мкл.

6.15.2 Наблюдения и обследования

[00215] Клинические признаки регистрировали по меньшей мере один раз в день, начиная приблизительно за две недели до начала приема препарата и продолжая в течение всего периода исследования. За животными устанавливали наблюдение относительно наличия признаков клинических эффектов, болезни и/или смерти.

[00216] Офтальмологическое обследование животных проводили перед введением дозы и в Дни 2, 8, 15 и 22. Всем животным с целью седации в/м вводили гидрохлорид кетамина для проведения офтальмологических обследований, проводимых после Дня 1. Для обследований в День 1 животных седировали посредством инъекционной анестезии (см. раздел 15.3.3). Перед обследованием глаза расширяли 1% тропикамидом. Обследование включало биомикроскопию с помощью щелевой лампы и непрямую офтальмоскопию. Кроме того, животным проводили аппланационную тонометрию перед введением дозы, сразу после введения дозы (примерно через 10–15 минут) и в Дни 2 и 22.

[00217] Образцы крови (~3 мл) собирали из периферической вены для анализа нейтрализующих антител примерно за 2-3 недели до введения дозы.

6.15.3 Сбор образцов для биоаналитического анализа

[00218] Образцы крови (~5 мл) собирали у животных натошак из периферической вены для анализа РВМС перед введением дозы (День 1), в Дни 8 и 15 и перед некропсией (День 22). Образцы получали с использованием пробирок с литий-гепарином, и регистрировали время.

[00219] Образцы крови собирали из периферической вены для биоаналитического анализа перед введением дозы (День 1, 2 мл) и некропсией (День 22, 5 мл). Образцы собирали в пробирки с активатором свертывания крови и регистрировали время. Пробирки выдерживали при комнатной температуре до полного свертывания, затем центрифугировали примерно при 2400 об/мин при комнатной температуре в течение 15 минут. Сыворотку собирали, помещали в промаркированные флаконы (некропсический образец делили на аликвоты по 1 мл), замораживали в жидком азоте и хранили при -60 °C или ниже.

6.15.4 Некроскопия

[00220] Макроскопическое исследование при некропсии проводили на любом животном, найденном мертвым или умерщвленным, а также при запланированной некропсии, по меньшей мере, после 21 дня лечения (День 22). Всех животных, кроме найденных мертвыми, седировали посредством в/м введения 8 мг/кг кетамина HCl, содержали на смеси изофлюран/кислород и всем вводили внутривенно болюс гепарина натрия, 200 МЕ/кг.

Животным перфузировали через левый желудочек сердца 0,001% раствор нитрита натрия в солевом растворе.

[00221] У всех животных были сохранены следующие ткани: костный мозг, головной мозг, слепая кишка, толстая кишка, задние нервные корешки и ганглии, двенадцатиперстная кишка, пищевод, глаза со зрительными нервами, макроскопические поражения, сердце, подвздошная кишка, тощая кишка, почки, коленный сустав, печень, легкие с бронхами, лимфатические узлы, яичники, поджелудочная железа, седалищный нерв, скелетные мышцы, спинной мозг, селезенка, щитовидная железа, трахея и блуждающий нерв.

6.15.5 Биоаналитический анализ

[00222] Количество копий вектора и количество транскриптов в тканях определяли методами количественной PCR и NGS.

6.15.6 Результаты

[00223] На **Фиг. 17А** представлены результаты анализа секвенирования нового поколения (NGS) различных структур и клеточных компонентов глаза (см. анатомию глаза на **Фиг. 16А** и **16В**), демонстрирующие относительное содержание (процентный состав) капсидного пула после IVT. Данные были нормализованы на основе состава AAV в первоначально введенном пуле и количественно оценены с учетом общего числа копий генома, полученного из анализа qPCR с комбинацией праймер-зонд, специфичной для последовательности eGFP. AAV2.7m8 применяли в качестве стандарта, и данные показывают наиболее эффективные капсиды относительно капсида AAV2.7m8.

[00224] На **Фиг. 17В** изображено количество транскриптов (РНК) в различных тканях глаза, показывающее относительное содержание (процентный состав) пула капсидов после IVT. Данные были нормализованы на основе состава AAV в первоначально введенном пуле и количественно оценены с учетом общего числа копий генома, полученного из анализа qPCR с комбинацией праймер-зонд, специфичной для последовательности eGFP. AAV2.7m8 применяли в качестве стандарта, и данные показывают наиболее эффективные капсиды относительно капсида AAV2.7m8.

6.16. Пример 15 – Биораспределение модифицированных капсидов у обезьян *Cynomolgus* после IVT инъекции

[00225] Введение, *in vivo* и посмертные наблюдения, а также биораспределение лучших

рекомбинантных AAV, полученных в результате скрининга штрих-кодированной библиотеки в NHP, будет оцениваться после однократной интравитреальной инъекции (IVT) обезьянам *Cynomolgus* (Таблица 6). Все животные в этом исследовании были наивными в отношении предшествующего лечения.

Таблица 6. Рекомбинантные AAV для исследования с IVT введением обезьянам *Cynomolgus*

Название	Капсид	Место вставки	Пептид	Пептид SEQ ID NO:
AAV2.7m8.455	AAV2	T455_T456	LALGETTRPA	9
AAV2.7m8.588	AAV2	N587_R588	LALGETTRPA	9
AAV3B	AAV3B	-	-	-
AAV3B.7m8	AAV3B	G454_T455	lALGETTRPA	9
AAVrh73	AAVrh73	-	-	-
AAVrh73.7m8	AAVrh73	G456_T457	LALGETTRPA	9

6.16.1 Дизайн исследования

[00226] Для каждого капсида будут использоваться две самки обезьяны *Cynomolgus*. Для оценки биораспределения, ассоциированного с различными AAV, вводимыми посредством IVT инъекции, будут собирать соответствующие ткани (см. Фиг. 16A и B). IVT инъекцию будут выполнять билатерально в виде болюсной инъекции в объеме дозы 50 мкл.

6.16.2 Наблюдения и обследования

[00227] Клинические признаки будут регистрировать по меньшей мере один раз в день, начиная приблизительно за две недели до начала приема препарата и продолжая в течение всего периода исследования. За животными будет установлено наблюдение относительно наличия признаков клинических эффектов, болезни и/или смерти.

[00228] Офтальмологическое обследование животных будут проводить перед введением дозы и в Дни 2, 8, 15 и 22. Все животные будут седированы путем в/м введения гидрохлорида кетамина для офтальмологических обследований, проводимых после Дня 1. Для обследования в День 1 животных будут седировать посредством инъекционной анестезии.

[00229] Перед обследованием глаза будут расширять 1% тропикамидом. Обследование

будет включать биомикроскопию с помощью щелевой лампы, непрямую офтальмоскопию, визуализацию глазного дна и ОСТ в выбранные моменты времени.

[00230] Образцы крови (~3 мл) будут собирать из периферической вены для анализа нейтрализующих антител примерно за 2-3 недели до введения дозы.

6.16.3 Сбор образцов для биоаналитического анализа

[00231] Образцы крови будут собирать из периферической вены для биоаналитического анализа перед введением дозы (День 1, 2 мл) и некропсией (День 28, 5 мл). Образцы будут собирать в пробирки с активатором свертывания крови и регистрировать время. Пробирки будут выдерживать при комнатной температуре до полного свертывания, затем центрифугировать примерно при 2400 об/мин при комнатной температуре в течение 15 минут. Сыворотку соберут, поместят в промаркированные флаконы (некропсический образец разделят на аликвоты по 1 мл), заморозят в жидком азоте и будут хранить при температуре -60 °C или ниже.

6.16.4 Некроскопия

[00232] Макроскопическое исследование при некропсии будут проводить на любом животном, найденном мертвым или умерщвленным, а также при запланированной некропсии, по меньшей мере, после 21 дня лечения (День 22). Всех животных, кроме найденных мертвыми, будут седировать посредством в/м введения 8 мг/кг кетамина HCl, содержать на смеси изофлюран/кислород и им будут вводить внутривенно болюс гепарина натрия, 200 МЕ/кг. Животным будут перфузировать через левый желудочек сердца 0,001% раствор нитрита натрия в солевом растворе.

[00233] Глаза будут собирать в конце исследования. Один глаз будут использовать для иммуногистохимии (ИНС), а другой – для изучения биораспределения. Могут быть собраны также периферические ткани.

6.16.5 Биоаналитический анализ

[00234] Количество копий вектора и количество транскриптов в глазу будут определять с помощью количественной PCR. Уровни экспрессии и локализация GFP будут исследовать с помощью ИНС.

6.17. Пример 16 – Биораспределение пула векторов rAAV у обезьян *Cynomolgus* после IVT инъекции

[00235] Объединенные штрих-кодированные векторы вводили NHP путем интравитреальной инъекции, и биораспределение векторной ДНК и РНК оценивали при умерщвлении через 3 недели после введения по протоколу, описанному в Примерах 14 и 15 ниже. В частности, пулы векторов вводили 2 группам из 2 взрослых обезьян *Macaca fascicularis* в оба глаза (билатерально) посредством IVT в соответствии с Таблицей 7 ниже:

Таблица 7

Группы	Титры NAB	Исследуемый препарат	Доза (GC/глаз)	Объем дозы	Эндотоксин (EU/мл)	Воспаление	Лечение
1	AAV2&9 < 1:2 AAV8 = 1:2	AAV-NAV-GFPb c-IVT1	3×10^{10}	50 мкл на глаз	0,058	Нет	Нет
	AAV2 = 1:6 AAV8&9 < 1:2			50 мкл на глаз		OS: легкое; OD: умеренное	Нет
2	AAV2 = 1:2 AAV8&9 < 1:2	AAV-NAV-GFPb c-IVT2	4×10^{11}	50 мкл на глаз	< 0,05	OD: легкое;	Нет
	AAV2 = 1:2 AAV8&9 < 1:2			50 мкл на глаз		OU: умеренное	Однократная доза ДепоМедрола (в/м); ежедневные местные

							стероидные капли
--	--	--	--	--	--	--	------------------

[00236] Офтальмологическое обследование проводили до введения дозы и в дни 2, 8, 15 и 22, включая биомикроскопию с помощью щелевой лампы, непрямую офтальмоскопию и измерение ИОР. На 3 неделе животных умерщвляли, ткани вырезали (см. анатомию глаза на Фиг. 16А и В) и образцы собирали в пробирки, содержащие RNeasy Lysis Buffer, и хранили в холодильнике. Относительное содержание векторной ДНК и транскрибированной трансенной РНК оценивали в образцах тканей относительно эталонных капсидов AAV8 и AAV9 с помощью обычного одностороннего анализа ANOVA с *апостериорными* множественными сравнениями Даннетта, сгенерированными с помощью программы prism.

[00237] Представлены результаты для первых 9 капсидов по относительному содержанию векторной ДНК и транскрибированной трансенной РНК по сравнению с относительным содержанием AAV9. На **Фиг. 18А - 18С** представлено относительное содержание (по отношению к AAV9) ДНК и РНК гAAV для девяти наиболее распространенных капсидов и контролей AAV8 и AAV9 в рассеченной ткани роговицы (**Фиг. 18А**), радужной оболочки (**Фиг. 18В**) и хрусталика (**Фиг. 18С**). В образцах тканей роговицы и хрусталика РНК не была обнаружена. На **Фиг. 19А - 19С** представлено относительное содержание (по отношению к AAV9) ДНК и РНК гAAV, экспрессируемых из трансгена, штрих-кодированного капсидом, для девяти наиболее распространенных капсидов и контролей AAV8 и AAV9 в тканях цилиарного тела (**Фиг. 19А**), шлеммова канала (**Фиг. 19В**) и трабекулярной сети (**Фиг. 19С**). Хотя РНК AAV3В не включена в гистограмму, она была обнаружена в ткани цилиарного тела (47-е место из 118 по относительному содержанию) и в трабекулярной сети (26-е место из 118 по относительному содержанию). На **Фиг. 20А - 20С** представлено относительное содержание (по отношению к AAV9) ДНК и РНК гAAV для девяти наиболее распространенных капсидов и контролей AAV8 и AAV9 в сетчатке (**Фиг. 20А**), RPE-хориоидальной оболочке (**Фиг. 20В**) и склере (**Фиг. 20С**). Хотя на гистограмме ее нет, ДНК AAV3В была обнаружена в склере (37-е место из 118 по относительному содержанию). Наконец, на **Фиг. 21А и 21В** продемонстрировано относительное содержание (по отношению к AAV9) ДНК и РНК гAAV для девяти наиболее распространенных капсидов и контролей AAV8 и AAV9 в зрительном нерве (глазничный сегмент) (**Фиг. 21А**) или зрительном нерве (черепной сегмент) (**Фиг. 20В**). РНК, транскрибированная с трансгена, не обнаруживается в образцах зрительного нерва ни в глазничном, ни в черепном сегменте.

[00238] Относительное содержание РНК по сравнению с капсидами AAV8 или AAV9 в ткани обобщено в Таблице 8 ниже.

Таблица 8

Глазная ткань NHP	Эталонный капсид	Самые эффективные капсиды (кратность относительного содержания РНК)
Радужная оболочка	AAV8	AAV3B (29X); AAVrh.73 (13X)
	AAV9	AAV3B (137X); AAVrh.73 (62X)
Цилиарное тело	AAV8	AAVhu.26 (4X)
	AAV9	AAVhu.26 (3X)
Трабекулярная сеть	AAV8	AAV1 (3X); AAVhu.26 (2X); AAV7 (2X)
	AAV9	AAV1 (4X); AAVhu.26 (3X); AAV7 (3X)
Сетчатка	AAV8	AAV3B (489X)
	AAV9	AAV3B (2479X)
RPE- хориоидальная оболочка	AAV8	AAV3B (123X)
	AAV9	AAV3B (481X)
Склера	AAV8	AAV1 (9X); AAV3B (7X)
	AAV9	AAV1 (8X); AAV3B (6X)

6.18. Пример 17 – Сравнение биораспределения векторов в пуле векторов rAAV у обезьян *Synomolgus* и мышей после IVT инъекции.

[00239] В этом примере сравнивается биораспределение пула векторов rAAV, вводимого интравитреально обезьянам *Synomolgus*, как описано в Примере 16, *ниже*, и мышам, как

описано в Примере 13. В этом примере 2 группам из 5 мышей C57BL/6 билатерально вводили объединенные векторы в каждый глаз, как подробно описано в Таблице 9 ниже, а затем умерщвляли через 3 недели после введения. Ткани одного глаза собирали и хранили в RNeasy для анализа РНК, а ткани другого глаза замораживали для анализа ДНК.

Таблица 9

Группы	Количество животных	Исследуемый препарат	Доза (GC/глаз)	Эндотоксин (EU/мл)	Объем дозы	Дата некропсии
1	5	AAV-NAV-GFPbc-IVT1	$1,2 \times 10^{10}$	0,058	2 мкл на глаз	3w
2	5	AAV-NAV-GFPbc-IVT2	$1,6 \times 10^{10}$	< 0,05	2 мкл на глаз	3w

[00240] Результаты биораспределения, демонстрирующие относительное содержание ДНК и РНК гAAV различных капсидов по отношению к AAV9 в ткани сетчатки мышей (Фиг. 22А) и NHP (Фиг. 22В), а также в RPE-хориоидальной оболочке мышей (Фиг. 23А) и NHP (Фиг. 23В). Хотя это и не отражено на гистограммах, ДНК AAV3В была обнаружена в RPE-хориоидальной оболочке мыши (73-е место из 118 капсидов по относительному содержанию по сравнению с AAV9), а РНК AAV3В была обнаружена в сетчатке мыши (81-е место из 118 капсидов по относительному содержанию по сравнению с AAV9) и в RPE-хориоидальной оболочке мыши (14-е место из 118 капсидов по относительному содержанию по сравнению с AAV9).

[00241] Это исследование продемонстрировало обогащение тканей сетчатки и RPE-хориоидальной оболочки AAV2 и AAV4, а также rh.73 как в тканях мыши, так и в тканях NHP, при введении гAAV посредством IVT-инъекции. Также наблюдали относительное преобладание (обогащение ДНК) rh.73 в пуле самок мышей, которым выполняли IVT-введение, как продемонстрировано на Фиг. 24.

6.19 Пример 18: Биораспределение капсидов препарата одного вектора гAAV AAV3В у обезьян *Сynomolgus* после интравитреальной (IVT) инъекции

[00242] Препарат вектора гAAV, содержащий один вектор AAV, AAV3В, экспрессирующий репортерный ген GFP из универсального промотора CAG (фланкированный ITR AAV2), вводили группе из 2 NHP путем IVT инъекции в дозе $1,61 \times 10^{11}$ GC/глаз (50 мкл на объем инъекции в глаз). Контрольный вектор AAV2-варианта (AAV2v),

экспрессирующий GFP, также вводили группе из 2 NHP путем IVT инъекции в дозе $1,61E11$ GC/глаз (50 мкл на объем инъекции в глаз). Исследование проводили по протоколу, аналогичному протоколу, описанному в предыдущих Примерах. *например*, Примеры 14, 15 и 16, тогда как биораспределение ДНК и РНК AAV3B или контрольного вектора в различных тканях глаза, а также в некоторых периферических тканях будет оцениваться после умерщвления через 3 недели после введения вектора.

[00243] Офтальмологическое обследование проводили до введения дозы и в отдельные дни с определенным интервалом после введения дозы, *например*, биомикроскопия с помощью щелевой лампы, непрямая офтальмоскопия и измерение IOP. На 3 неделе животных умерщвляли, глазные ткани, а также зрительный нерв вырезали и извлекали (см. анатомию глаза на Фиг. 16А и В). Также выделяли моноклеарные клетки периферической крови (PBMC), печень, головной мозг и слезные железы. Собирали ткани из правого глаза, образцы помещали в пробирки с RNeasy (в соответствии с инструкциями производителя) и подвергали мгновенной заморозке при -80°C до проведения qPCR. Биораспределение капсида AAV3B и экспрессию трансгена анализировали в тканях левого глаза каждого субъекта методами RT-qPCR. Ткани правого глаза каждого субъекта энуклеировали, собирали в 4% параформальдегиде и обработаны для парафинового блока и оценивали с помощью иммуногистохимии (ИHC) на экспрессию GFP, а также окрашивание гематоксилином и эозином (H&E) для гистопатологического анализа.

6.20 Пример 19: Капсидное биораспределение пула векторов gAAV у обезьян Synomolgus после инъекции в супрахориоидальное пространство (SCS)

[00244] Объединенные штрих-кодированные векторы вводили в NHP путем супрахориоидальной инъекции. Объединенная смесь состоит из 118 различных капсидов AAV, включая природные изоляты и сконструированные AAV, как описано в настоящем документе, экспрессирующих репортерный ген GFP из универсального промотора CAG. Супрахориоидальное исследование проводили по протоколу, аналогичному протоколу, описанному в Примерах 14, 15 и 16, *ниже*, за исключением того, что пулы векторов вводили 2 взрослым обезьянам Synomolgus в оба глаза (билатерально) посредством SCS в дозе $7,2E11$ GC/глаз. Перед супрахориоидальными инъекциями животных анестезировали кетамин и дексмететомидином. Библиотеку AAV (пул) доставляли в супрахориоидальное пространство (SCS) каждого глаза путем однократной SCS инъекции 100 мкл.

[00245] Офтальмологическое обследование проводили до введения дозы и в отдельные дни с определенным интервалом, *например*, биомикроскопия с помощью щелевой лампы,

непрямая офтальмоскопия и измерение ИОР. На 3 неделе животных умерщвляли, ткани собирали, а образцы помещали в пробирки с RNAlater (в соответствии с инструкциями производителя) и мгновенно замораживали при -80 °C до выполнения анализа ДНК и РНК (биораспределение каждого вектора в пуле) с помощью NGS в тканях глаза, включая водянистую влагу, стекловидное тело, хориоидальную оболочку – пигментный эпителий сетчатки (RPE), роговицу, радужно-цилиарное тело, хрусталик, зрительный нерв, сетчатку и склеру.

6.21. Аминокислотные последовательности капсида

[00246] В Таблице 10 представлены аминокислотные последовательности некоторых сконструированных капсидных белков и немодифицированных капсидных белков, описанных и/или использованных в исследованиях, приведенных в данном документе. Гетерологичные пептиды и аминокислотные замены обозначены серым цветом.

Таблица 10. Аминокислотные последовательности капсида

Название капсида	Вставка или замена	Аминокислотная последовательность
PHP.S (Калифорнийский технологический институт - Chan et al 2017)	QAVRTSL (SEQ ID NO:16) (588_589)	1 MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWALKPGAP QPKANQQHQD NARGLVLPGY KYLGPGNGLD 61 KGEPVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNPY LKYNHADA EF QERLKEDTSF GGNLGRAVFQ 121 AKKRLLEPLG LVEEAAKTAP GKGRPVEQSP QEPDSSAGIG KSGAQPAKKR LNFGQTGDTE 181 SVPDPQPIGE PPAAPSGVGS LTMASGGGAP VADNNEGADG VGSSSGNWHC DSQWLGD RVI 241 TTSTRTWALP TYNNHLYKQI SNSTSGGSSN DNAYFGYSTP WGYFDFNRFH CHFSPRDWQR 301 LINNNWGFRP KRLNFKLFNI QVKEVTDNNG VKTIANNLTS TVQVFTDSY QLPYVLGSAH 361 EGCLPPFPAD VFMIPQGYL TLNDGSQAVG RSSFYCLEYF PSQMLRTGNN FQFSYEFENV 421 PFHSSY AHSQ SLDRLMNPLI DQYLYLSRT INSGSQNQQT LKFSVAGPSN MAVQGRNYIP 481 GPSYRQQRVS TTVTQNNSE FAWPGASSWA LNGRNSLMNP GPAMASHKEG EDRFFPLSGS 541 LIFGKQGTGR DNVDADK VMI TNEEEIKTTN PVATESYQV ATNHQSAQQA VRTSLAQ AQT 601 GWVQNQGILP GMVWQDRDVY LQGPIWAKIP HTDGNFHPSP LMGGFGMKHP PPQILIKNTP 661 VPADPPTAFN KDKLNSFITQ YSTGQVSVEI EWELQKENS K RWNPEIQYTS NYYKSNNVEF 721 AVNTEGVYSE PRPIGTRYLT RNL (SEQ ID NO:22)
PHP.SH	QAVRTSH (SEQ ID NO:17) (588_589)	1 MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWALKPGAP QPKANQQHQD NARGLVLPGY KYLGPGNGLD 61 KGEPVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNPY LKYNHADA EF QERLKEDTSF GGNLGRAVFQ 121 AKKRLLEPLG LVEEAAKTAP GKGRPVEQSP QEPDSSAGIG KSGAQPAKKR LNFGQTGDTE 181 SVPDPQPIGE PPAAPSGVGS LTMASGGGAP VADNNEGADG VGSSSGNWHC DSQWLGD RVI 241 TTSTRTWALP TYNNHLYKQI SNSTSGGSSN DNAYFGYSTP WGYFDFNRFH CHFSPRDWQR 301 LINNNWGFRP KRLNFKLFNI QVKEVTDNNG VKTIANNLTS TVQVFTDSY QLPYVLGSAH 361 EGCLPPFPAD VFMIPQGYL TLNDGSQAVG RSSFYCLEYF PSQMLRTGNN FQFSYEFENV 421 PFHSSY AHSQ SLDRLMNPLI DQYLYLSRT INSGSQNQQT LKFSVAGPSN MAVQGRNYIP 481 GPSYRQQRVS TTVTQNNSE FAWPGASSWA LNGRNSLMNP GPAMASHKEG EDRFFPLSGS 541 LIFGKQGTGR DNVDADK VMI TNEEEIKTTN PVATESYQV ATNHQSAQQA VRTSHAQ AQT 601 GWVQNQGILP GMVWQDRDVY LQGPIWAKIP HTDGNFHPSP LMGGFGMKHP PPQILIKNTP 661 VPADPPTAFN KDKLNSFITQ YSTGQVSVEI EWELQKENS K RWNPEIQYTS NYYKSNNVEF 721 AVNTEGVYSE PRPIGTRYLT RNL (SEQ ID NO:23)

Название капсида	Вставка или замена	Аминокислотная последовательность
PHP.B (Калифорнийский технологический институт, запись в GenBank: ALU8515 6.1-Deverman et al 2016)	TLAVPFK (SEQ ID NO:20) (588_589)	1 MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWALKPGAP QPKANQQHQD NARGLVLPGY KYLGPGNGLD 61 KGEPVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNPY LKYNHADA EF QERLKEDTSF GGNLGRAVFQ 121 AKKRLEPLG LVEEAAKTAP GKRPVEQSP QEPDSSAGIG KSGAQPAKKR LNFGQTGDTE 181 SVPDPQPIGE PPAAPSGVGS LTMASGGGAP VADNNEGADG VGSSSGNWHC DSQWLGD RVI 241 TTSTRTWALP TYNNHLYKQI SNSTSGGSSN DNAYFGYSTP WGYFDNRFH CHFSPRDWQR 301 LINNNWGFRP KRLNFKLFNI QVKEVTDNNG VKTIANNLTS TVQVFTDSY QLPYVLGSAH 361 EGCLPPFPAD VFMIPQYGYL TLNDGSQAVG RSSFYCLEYF PSQMLRTGNN FQFSYEFENV 421 PFHSSYAHSQ SLDRLMNPLI DQYLYLSRT INSGSQNQQT LKFSVAGPSN MAVQGRNYIP 481 GPSYRQQRVS TTVTQNNNSE FAWPGASSWA LNGRNSLMNP GPAMASHKEG EDRFFPLSGS 541 LIFGKQGTGR DNVDADK VMI TNEEEIKTTN PVATESYQGV ATNHQSAQTL AVPFKAQAQT 601 GWVQNQGILP GMVWQDRDVY LQGPIWAKIP HTDGNFHPSP LMGGFGMKHP PPQILIKNT 661 VPADPPTAFN KDKLNSFITQ YSTGQVSVEI EWELQKENS RWNPEIQYTS NYYSNNVEF 721 AVNTEGVYSE PRPIGTRYLT RNL (SEQ ID NO:24)
PHP.eB (Калифорнийский технологический институт - Chan et al 2017)	TLAVPFK (SEQ ID NO:20) (588_589)	1 MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWALKPGAP QPKANQQHQD NARGLVLPGY KYLGPGNGLD 61 KGEPVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNPY LKYNHADA EF QERLKEDTSF GGNLGRAVFQ 121 AKKRLEPLG LVEEAAKTAP GKRPVEQSP QEPDSSAGIG KSGAQPAKKR LNFGQTGDTE 181 SVPDPQPIGE PPAAPSGVGS LTMASGGGAP VADNNEGADG VGSSSGNWHC DSQWLGD RVI 241 TTSTRTWALP TYNNHLYKQI SNSTSGGSSN DNAYFGYSTP WGYFDNRFH CHFSPRDWQR 301 LINNNWGFRP KRLNFKLFNI QVKEVTDNNG VKTIANNLTS TVQVFTDSY QLPYVLGSAH 361 EGCLPPFPAD VFMIPQYGYL TLNDGSQAVG RSSFYCLEYF PSQMLRTGNN FQFSYEFENV 421 PFHSSYAHSQ SLDRLMNPLI DQYLYLSRT INSGSQNQQT LKFSVAGPSN MAVQGRNYIP 481 GPSYRQQRVS TTVTQNNNSE FAWPGASSWA LNGRNSLMNP GPAMASHKEG EDRFFPLSGS 541 LIFGKQGTGR DNVDADK VMI TNEEEIKTTN PVATESYQGV ATNHQSDGTL AVPFKAQAQT 601 GWVQNQGILP GMVWQDRDVY LQGPIWAKIP HTDGNFHPSP LMGGFGMKHP PPQILIKNT 661 VPADPPTAFN KDKLNSFITQ YSTGQVSVEI EWELQKENS RWNPEIQYTS NYYSNNVEF 721 AVNTEGVYSE PRPIGTRYLT RNL (SEQ ID NO:25)
AAV8.B BB	A269S	MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWALKPGAP KPKANQQKQD DGRGLVLPGY KYLGPFNGLD 60 KGEPVNAADA AALEHDKAYD QQLQAGDNPY LRYNHADA EF QERLQEDTSF GGNLGRAVFQ 120 AKKR VLEPLG LVEEGA KTAP GKRPVEPSP QRSPDSSTGI GKKGQQPARK RLNFGQTGDS 180 ESVPDPQPLG EPPAAPSGVG PNTMAAGGGA PMADNNEGAD GVGSSSGNWH CDSTWLGD RVI 240 ITTSTRTWAL PTYNNHLYKQ ISNGTSGGST NDNTYFGYST PWGYFDNRF HCHFSPRDWQ 300 RLINNNWGFR PKRLSFKLFNI QVKEVTQNE GTKTIANNLT STIQVFTDSE YQLPYVLGSA 360 HQGCLPPFPA DVFMIPQYGY LTLNNGSQAV GRSSFYCLEY FPSQMLRTGN NFQFTYTFED 420 VPFHSSYAHS QSLDRLMNPL IDQYLYLSR TQTTGGTANT QTLGFSQGGP NTMANQAKNW 480 LPGPCYRQQR VSTTTGQNNN SNFAWTAGTK YHLNGRNSLA NPGIAMATHK DDEERFFPSN 540 GILIFGKQNA ARDNADYSDV MLTSEEEIKT TNPVATEEY IVADNLQQQN TAPQIGTVNS 600 QGALPGMVWQ NRDVYLQGP WAKIPHTDGN FHPSPLMGGF GLKHPPPQIL IKNTVPADP 660 PTTFNQSKLN SFITQYSTGQ VSVEIEWELQ KENSKRWNP IQYTSNYYS TSVDFAVNTE 720 GVYSEPRPIG TRYLTRNL (SEQ ID NO:26)
AAV8.B BB. LD	A269S, 498_NNN/ AAA_500	MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWALKPGAP KPKANQQKQD DGRGLVLPGY KYLGPFNGLD 60 KGEPVNAADA AALEHDKAYD QQLQAGDNPY LRYNHADA EF QERLQEDTSF GGNLGRAVFQ 120 AKKR VLEPLG LVEEGA KTAP GKRPVEPSP QRSPDSSTGI GKKGQQPARK RLNFGQTGDS 180 ESVPDPQPLG EPPAAPSGVG PNTMAAGGGA PMADNNEGAD GVGSSSGNWH CDSTWLGD RVI 240 ITTSTRTWAL PTYNNHLYKQ ISNGTSGGST NDNTYFGYST PWGYFDNRF HCHFSPRDWQ 300 RLINNNWGFR PKRLSFKLFNI QVKEVTQNE GTKTIANNLT STIQVFTDSE YQLPYVLGSA 360 HQGCLPPFPA DVFMIPQYGY LTLNNGSQAV GRSSFYCLEY FPSQMLRTGN NFQFTYTFED 420 VPFHSSYAHS QSLDRLMNPL IDQYLYLSR TQTTGGTANT QTLGFSQGGP NTMANQAKNW 480

Название капсида	Вставка или замена	Аминокислотная последовательность
		LPGPCYRQQR VSTTTGQAAA SNFAWTAGTK YHLNGRNSLA NPGIAMATHK DDEERFFPSN 540 GILIFGKQNA ARDNADYSDV MLTSEEEIKT TNPVATEEYG IVADNLQQQN TAPQIGTVNS 600 QGALPGMVWQ NRDVYLQGPI WAKIPHTDGN FHPSPLMGGF GLKHPPQIL IKNTVPADP 660 PTTFNQSKLN SFITQYSTGQ VSVEIEWELQ KENSKRWNP IQYTSNYYS TSVDFAVNTE 720 GVYSEPRPIG TRYLTRNL (SEQ ID NO:27)
AAV9.B BB	S263G/ S269T/ A273T	MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWALKPGAP QPKANQQHQD NARGLVLPGY KYLGPGNGLD 60 KGEPVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNPY LKYNHADA EF QERLKEDTSF GGNLGRAVFQ 120 AKKRLLLEPLG LVEEAAKTAP GKKRPVEQSP QEPDSSAGIG KSGAQPAKKR LNFGQTGDTE 180 SVPDPQPIGE PPAAPSGVGS LTMASSGGGAP VADNNEGADG VGSSSGNWHC DSQWLGD RVI 240 TTSTRTWALP TYNNHLYKQI SNGTSGGSTN DNTYFGYSTP WGYFDFNRFH CHFSPRDWQR 300 LINNNWGFRP KRLNFKLFNI QVKEVTDNNG VKTIANNLTS TVQVFTDSY QLPYVLGSAH 360 EGCLPPFPAD VFMIPQYGYL TLNDGSQAVG RSSFYCLEYF PSQMLRTGNN FQFSYEFENV 420 PFHSSY AHSQ SLDRLMNPLI DQYL YYLSKT INSGSQNQQT LKFSVAGPSN MAVQGRNYIP 480 GPSYRQQRVS TTVTQNNNSE FAWPGASSWA LNGRNSLMNP GPAMASHKEG EDRFFPLSGS 540 LIFGKQGTGR DNVDADK VMI TNEEEIKTTN PVATESYGGV ATNHQSAQAQ AQTGWVQNQG 600 ILPGMVWQDR DVYVLQGIWA KIPHTDGNFH PSPLMGGFGM KHPPQILIK NTPVPADPPT 660 AFNKDKLNSF ITQYSTGQVS VEIEWELQKE NSKRWNP EIY YTSNYYSNN VEFVNTTEGV 720 YSEPRPIGTR YLTRNL (SEQ ID NO:28)
AAV9.B BB. LD	S263G/ S269T/ A273T, 496_NNN/ AAA_498	MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWALKPGAP QPKANQQHQD NARGLVLPGY KYLGPGNGLD 60 KGEPVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNPY LKYNHADA EF QERLKEDTSF GGNLGRAVFQ 120 AKKRLLLEPLG LVEEAAKTAP GKKRPVEQSP QEPDSSAGIG KSGAQPAKKR LNFGQTGDTE 180 SVPDPQPIGE PPAAPSGVGS LTMASSGGGAP VADNNEGADG VGSSSGNWHC DSQWLGD RVI 240 TTSTRTWALP TYNNHLYKQI SNGTSGGSTN DNTYFGYSTP WGYFDFNRFH CHFSPRDWQR 300 LINNNWGFRP KRLNFKLFNI QVKEVTDNNG VKTIANNLTS TVQVFTDSY QLPYVLGSAH 360 EGCLPPFPAD VFMIPQYGYL TLNDGSQAVG RSSFYCLEYF PSQMLRTGNN FQFSYEFENV 420 PFHSSY AHSQ SLDRLMNPLI DQYL YYLSKT INSGSQNQQT LKFSVAGPSN MAVQGRNYIP 480 GPSYRQQRVS TTVTQAAASE FAWPGASSWA LNGRNSLMNP GPAMASHKEG EDRFFPLSGS 540 LIFGKQGTGR DNVDADK VMI TNEEEIKTTN PVATESYGGV ATNHQSAQAQ AQTGWVQNQG 600 ILPGMVWQDR DVYVLQGIWA KIPHTDGNFH PSPLMGGFGM KHPPQILIK NTPVPADPPT 660 AFNKDKLNSF ITQYSTGQVS VEIEWELQKE NSKRWNP EIY YTSNYYSNN VEFVNTTEGV 720 YSEPRPIGTR YLTRNL (SEQ ID NO:29)
AAVrh.1 0.LD	498_NNN/ AAA_500	MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWDLKPGAP KPKANQQKQD DGRGLVLPGY 50 KYLGPFNGLD KGEPVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNPY LRYNHADA EF 100 QERLQEDTSF GGNLGRAVFQ AKKRVLEPLG LVEEGAKTAP GKKRPVEPSP 150 QRSPDSSTGI GKKGQQPAKK RLNFGQTGDS ESVPDPQPIG EPPAGPSGLG 200 SGTMAAGGGA PMADNNEGAD GVGSSSGNWH CDSTWLGD RVI 250 PTYNNHLYKQ ISNGTSGGST NDNTYFGYST PWGYFDFNRF HCHFSPRDWQ 300 RLINNNWGFR PKRLNFKLFNI QVKEVTQNE GTKTIANNLT STIQVFTDSE 350 YQLPYVLGSA HQGCLPPFPA DVFMIPQYGY LTLNNGSQAV GRSSFYCLEY 400 FPSQMLRTGN NFEFSYQFED VPFHSSY AHS QSLDRLMNPL IDQYL YYLSR 450 TQSTGGTAGT QQLFSQAGP NNMSAQAKNW LPGPCYRQQR VSTTTSQAAA 500 SNFAWTGATK YHLNGRDSL V NPGVAMATHK DDEERFFPS GVL MFGKQGA 550 GKDNVDYSSV MLTSEEEIKT TNPVATEQYG VVADNLQQQN AAPIVGAVNS 600 QGALPGMVWQ NRDVYLQGPI WAKIPHTDGN FHPSPLMGGF GLKHPPQIL 650 IKNTVPADP PTTFQAKLA SFITQYSTGQ VSVEIEWELQ KENSKRWNP 700 IQYTSNYYS TNVDFAVNTD GTYSEPRPIG TRYLTRNL (SEQ ID NO:30)
AAV9.49 6NNN/A AA498	498_NNN/ AAA_500	MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWALKPGAP QPKANQQHQD NARGLVLPGY KYLGPGNGLD 60 KGEPVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNPY LKYNHADA EF QERLKEDTSF GGNLGRAVFQ 120 AKKRLLLEPLG LVEEAAKTAP GKKRPVEQSP QEPDSSAGIG KSGAQPAKKR LNFGQTGDTE 180 SVPDPQPIGE PPAAPSGVGS LTMASSGGGAP VADNNEGADG VGSSSGNWHC DSQWLGD RVI 240

Название капсида	Вставка или замена	Аминокислотная последовательность
		TTSTRTWALP TYNNHLYKQI SNSTSGGSSN DNAYFGYSTP WGYFDFNRFH CHFSPRDWQR 300 LINNNWGFRP KRLNFKLFNI QVKEVTDNNG VKTIANNLTS TVQVFTDSY QLPYVLGSAH 360 EGCLPPFPAD VMIPQYGYL TLNDGSQAVG RSSFYCLEYF PSQMLRTGNN FQFSYEFENV 420 PFHSSY AHSQ SLDRLMNPLI DQYLYYLSKT INSGGQNQQT LKFSVAGPSN MAVQGRNYIP 480 GPSYRQQRVS TTVTQAAASE FAWPGASSWA LNGRNSLMNP GPAMASHKEG EDRFFPLSGS 540 LIFGKQGTGR DNVADK VMI TNEEEIKTTN PVATESYGGV ATNHQSAQAQ AQTGWVQNQG 600 ILPGMVWQDR DVYLGQPIWA KIPHTDGNFH PSPLMGGFGM KHPPPQILIK NTPVPADPPT 660 AFNKDKLNSF ITQYSTGQVS VEIEWELQKE NSKRWNPEIQ YTSNYYKSNN VEFVNTEGV 720 YSEPRPIGTR YLTRNL (SEQ ID NO:31)
AAV9.49 6NNN/A AA498. W503R	496NNN/ AAA498, W503R	MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWALKPGAP QPKANQQHQD NARGLVLPY KYLGPGNGLD 60 KGEPVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNPY LKYNHADA EF QERLKEDTSF GGNLGRAVFQ 120 AKKRLLEPLG LVEEAAKTAP GKKRPVEQSP QEPDSSAGIG KSGAQPAKKR LNFGQTGDTE 180 SVPDPQPIGE PPAAPSGVGS LTMASGGGAP VADNNEGADG VGSSSGNWHC DSQWLGD RVI 240 TTSTRTWALP TYNNHLYKQI SNSTSGGSSN DNAYFGYSTP WGYFDFNRFH CHFSPRDWQR 300 LINNNWGFRP KRLNFKLFNI QVKEVTDNNG VKTIANNLTS TVQVFTDSY QLPYVLGSAH 360 EGCLPPFPAD VMIPQYGYL TLNDGSQAVG RSSFYCLEYF PSQMLRTGNN FQFSYEFENV 420 PFHSSY AHSQ SLDRLMNPLI DQYLYYLSKT INSGGQNQQT LKFSVAGPSN MAVQGRNYIP 480 GPSYRQQRVS TTVTQAAASE FARPGASSWA LNGRNSLMNP GPAMASHKEG EDRFFPLSGS 540 LIFGKQGTGR DNVADK VMI TNEEEIKTTN PVATESYGGV ATNHQSAQAQ AQTGWVQNQG 600 ILPGMVWQDR DVYLGQPIWA KIPHTDGNFH PSPLMGGFGM KHPPPQILIK NTPVPADPPT 660 AFNKDKLNSF ITQYSTGQVS VEIEWELQKE NSKRWNPEIQ YTSNYYKSNN VEFVNTEGV 720 YSEPRPIGTR YLTRNL (SEQ ID NO:32)
AAV9 W503R	W503R	MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWALKPGAP QPKANQQHQD NARGLVLPY KYLGPGNGLD 60 KGEPVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNPY LKYNHADA EF QERLKEDTSF GGNLGRAVFQ 120 AKKRLLEPLG LVEEAAKTAP GKKRPVEQSP QEPDSSAGIG KSGAQPAKKR LNFGQTGDTE 180 SVPDPQPIGE PPAAPSGVGS LTMASGGGAP VADNNEGADG VGSSSGNWHC DSQWLGD RVI 240 TTSTRTWALP TYNNHLYKQI SNSTSGGSSN DNAYFGYSTP WGYFDFNRFH CHFSPRDWQR 300 LINNNWGFRP KRLNFKLFNI QVKEVTDNNG VKTIANNLTS TVQVFTDSY QLPYVLGSAH 360 EGCLPPFPAD VMIPQYGYL TLNDGSQAVG RSSFYCLEYF PSQMLRTGNN FQFSYEFENV 420 PFHSSY AHSQ SLDRLMNPLI DQYLYYLSKT INSGGQNQQT LKFSVAGPSN MAVQGRNYIP 480 GPSYRQQRVS TTVTQNNNSE FARPGASSWA LNGRNSLMNP GPAMASHKEG EDRFFPLSGS 540 LIFGKQGTGR DNVADK VMI TNEEEIKTTN PVATESYGGV ATNHQSAQAQ AQTGWVQNQG 600 ILPGMVWQDR DVYLGQPIWA KIPHTDGNFH PSPLMGGFGM KHPPPQILIK NTPVPADPPT 660 AFNKDKLNSF ITQYSTGQVS VEIEWELQKE NSKRWNPEIQ YTSNYYKSNN VEFVNTEGV 720 YSEPRPIGTR YLTRNL (SEQ ID NO:33)
AAV9 Q474A	Q474A	MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWALKPGAP QPKANQQHQD NARGLVLPY KYLGPGNGLD 60 KGEPVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNPY LKYNHADA EF QERLKEDTSF GGNLGRAVFQ 120 AKKRLLEPLG LVEEAAKTAP GKKRPVEQSP QEPDSSAGIG KSGAQPAKKR LNFGQTGDTE 180 SVPDPQPIGE PPAAPSGVGS LTMASGGGAP VADNNEGADG VGSSSGNWHC DSQWLGD RVI 240 TTSTRTWALP TYNNHLYKQI SNSTSGGSSN DNAYFGYSTP WGYFDFNRFH CHFSPRDWQR 300 LINNNWGFRP KRLNFKLFNI QVKEVTDNNG VKTIANNLTS TVQVFTDSY QLPYVLGSAH 360 EGCLPPFPAD VMIPQYGYL TLNDGSQAVG RSSFYCLEYF PSQMLRTGNN FQFSYEFENV 420 PFHSSY AHSQ SLDRLMNPLI DQYLYYLSKT INSGGQNQQT LKFSVAGPSN MAVAGRNYIP 480 GPSYRQQRVS TTVTQNNNSE FAWPGASSWA LNGRNSLMNP GPAMASHKEG EDRFFPLSGS 540 LIFGKQGTGR DNVADK VMI TNEEEIKTTN PVATESYGGV ATNHQSAQAQ AQTGWVQNQG 600 ILPGMVWQDR DVYLGQPIWA KIPHTDGNFH PSPLMGGFGM KHPPPQILIK NTPVPADPPT 660 AFNKDKLNSF ITQYSTGQVS VEIEWELQKE NSKRWNPEIQ YTSNYYKSNN VEFVNTEGV 720 YSEPRPIGTR YLTRNL (SEQ ID NO:34)
AAV9 S454-D8	Bone1, DDDDDD	MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWALKPGAP QPKANQQHQD NARGLVLPY KYLGPGNGLD 60 KGEPVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNPY LKYNHADA EF QERLKEDTSF GGNLGRAVFQ 120

Название капсида	Вставка или замена	Аминокислотная последовательность
	DD (SEQ ID NO:2) (454_455)	AKKRLLLEPLG LVEEAAKTAP GKKRPVEQSP QEPDSSAGIG KSGAQPAKKR LNFGQTGDTE 180 SVPDPQPIGE PPAAPSGVGS LTMASGGGAP VADNNEGADG VGSSSGNWHC DSQWLGD RVI 240 TTSTRTWALP TYNNHLYKQI SNSTSGGSSN DNAYFGYSTP WGYFDFNRFH CHFSPRDWQR 300 LINNNWGFRP KRLNFKLFNI QVKEVTDNNG VKTIANNLTS TVQVFTDSY QLPYVLGSAH 360 EGCLPPFPAD VFMIPQYGYL TLNDGSQAVG RSSFYCLEYF PSQMLRTGNN FQFSYEFENV 420 PFHSSYAHSQ SLDRLMNPLI DQYLYYLSKT INGSDDDDDD DDGQNQQTLKF SVAGPSNMAV481 QGRNYIPGPS YRQQRVSTTV TQNNNSEFAW PGASSWALNG RNSLMNPGPA MASHKEGEDR 541 FFPLSGSLIF GKQGTGRDNV DADKVMITNE EEIKTTNPVA TESYGQVATN HQSAQAQAQT 601 GWVQNQGILP GMVWQDRDVY LQGPIWAKIP HTDGNFHPSP LMGGFGMKHP PPQILIKNTP 661 VPADPPTAFN KDKLNSFITQ YSTGQVSVEI EWELQKENS K RWNPEIQYTS NYYKSNNVEF 721 AVNTEGVYSE PRPIGTRYLT RNL (SEQ ID NO:35)
AAV9 S454- Brain1	Brain1, LSSRLDA (SEQ ID NO:3) (454_455)	MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWALKPGAP QPKANQQHQD NARGLVLPGY KYLGPGNGLD 60 KGEPVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNPY LKYNHADA EF QERLKEDTSF GGNLGRAVFQ 120 AKKRLLLEPLG LVEEAAKTAP GKKRPVEQSP QEPDSSAGIG KSGAQPAKKR LNFGQTGDTE 180 SVPDPQPIGE PPAAPSGVGS LTMASGGGAP VADNNEGADG VGSSSGNWHC DSQWLGD RVI 240 TTSTRTWALP TYNNHLYKQI SNSTSGGSSN DNAYFGYSTP WGYFDFNRFH CHFSPRDWQR 300 LINNNWGFRP KRLNFKLFNI QVKEVTDNNG VKTIANNLTS TVQVFTDSY QLPYVLGSAH 360 EGCLPPFPAD VFMIPQYGYL TLNDGSQAVG RSSFYCLEYF PSQMLRTGNN FQFSYEFENV 420 PFHSSYAHSQ SLDRLMNPLI DQYLYYLSKT INGSLSRLD AGQNQQTLKF SVAGPSNMAV 480 QGRNYIPGPS YRQQRVSTTV TQNNNSEFAW PGASSWALNG RNSLMNPGPA MASHKEGEDR 540 FFPLSGSLIF GKQGTGRDNV DADKVMITNE EEIKTTNPVA TESYGQVATN HQSAQAQAQT 600 GWVQNQGILP GMVWQDRDVY LQGPIWAKIP HTDGNFHPSP LMGGFGMKHP PPQILIKNTP 660 VPADPPTAFN KDKLNSFITQ YSTGQVSVEI EWELQKENS K RWNPEIQYTS NYYKSNNVEF 720 AVNTEGVYSE PRPIGTRYLT RNL (SEQ ID NO:36)
AAV9 S454- Brain2	Brain2/ Brain1C, CLSSRLD AC (SEQ ID NO:4) (454_455)	MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWALKPGAP QPKANQQHQD NARGLVLPGY KYLGPGNGLD 60 KGEPVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNPY LKYNHADA EF QERLKEDTSF GGNLGRAVFQ 120 AKKRLLLEPLG LVEEAAKTAP GKKRPVEQSP QEPDSSAGIG KSGAQPAKKR LNFGQTGDTE 180 SVPDPQPIGE PPAAPSGVGS LTMASGGGAP VADNNEGADG VGSSSGNWHC DSQWLGD RVI 240 TTSTRTWALP TYNNHLYKQI SNSTSGGSSN DNAYFGYSTP WGYFDFNRFH CHFSPRDWQR 300 LINNNWGFRP KRLNFKLFNI QVKEVTDNNG VKTIANNLTS TVQVFTDSY QLPYVLGSAH 360 EGCLPPFPAD VFMIPQYGYL TLNDGSQAVG RSSFYCLEYF PSQMLRTGNN FQFSYEFENV 420 PFHSSYAHSQ SLDRLMNPLI DQYLYYLSKT INGSCLSSRL DACGQNQQTL KFSVAGPSNM AV 482 QGRNYIPGPS YRQQRVSTTV TQNNNSEFAW PGASSWALNG RNSLMNPGPA MASHKEGEDR 542 FFPLSGSLIF GKQGTGRDNV DADKVMITNE EEIKTTNPVA TESYGQVATN HQSAQAQAQT 602 GWVQNQGILP GMVWQDRDVY LQGPIWAKIP HTDGNFHPSP LMGGFGMKHP PPQILIKNTP 662 VPADPPTAFN KDKLNSFITQ YSTGQVSVEI EWELQKENS K RWNPEIQYTS NYYKSNNVEF 722 AVNTEGVYSE PRPIGTRYLT RNL (SEQ ID NO:37)
AAV9 S454- Kidney1	Kidney1, LPVAS (SEQ ID NO:6) (454_455)	MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWALKPGAP QPKANQQHQD NARGLVLPGY KYLGPGNGLD 60 KGEPVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNPY LKYNHADA EF QERLKEDTSF GGNLGRAVFQ 120 AKKRLLLEPLG LVEEAAKTAP GKKRPVEQSP QEPDSSAGIG KSGAQPAKKR LNFGQTGDTE 180 SVPDPQPIGE PPAAPSGVGS LTMASGGGAP VADNNEGADG VGSSSGNWHC DSQWLGD RVI 240 TTSTRTWALP TYNNHLYKQI SNSTSGGSSN DNAYFGYSTP WGYFDFNRFH CHFSPRDWQR 300 LINNNWGFRP KRLNFKLFNI QVKEVTDNNG VKTIANNLTS TVQVFTDSY QLPYVLGSAH 360 EGCLPPFPAD VFMIPQYGYL TLNDGSQAVG RSSFYCLEYF PSQMLRTGNN FQFSYEFENV 420 PFHSSYAHSQ SLDRLMNPLI DQYLYYLSKT INGS LPVASG QNQQTLKFSV AGPSNMAV 478 QGRNYIPGPS YRQQRVSTTV TQNNNSEFAW PGASSWALNG RNSLMNPGPA MASHKEGEDR 538 FFPLSGSLIF GKQGTGRDNV DADKVMITNE EEIKTTNPVA TESYGQVATN HQSAQAQAQT 598 GWVQNQGILP GMVWQDRDVY LQGPIWAKIP HTDGNFHPSP LMGGFGMKHP PPQILIKNTP 658 VPADPPTAFN KDKLNSFITQ YSTGQVSVEI EWELQKENS K RWNPEIQYTS NYYKSNNVEF 718 AVNTEGVYSE PRPIGTRYLT RNL (SEQ ID NO:38)

Название капсида	Вставка или замена	Аминокислотная последовательность
AAV9 S454- Kidney2	Kidney2/ Kidney1C, CLPVASC (SEQ ID NO:5) (454_455)	MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWALKPGAP QPKANQQHQD NARGLVLPGY KYLGPGNGLD 60 KGEPVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNPY LKYNHADA EF QERLKEDTSF GGNLGRAVFQ 120 AKKRLLLEPLG LVEEAAKTAP GKKRPVEQSP QEPDSSAGIG KSGAQPAKKR LNFGQTGDTE 180 SVPDPQPIGE PPAAPSGVGS LTMASGGGAP VADNNEGADG VGSSSGNWHC DSQWLGD RVI 240 TTSTRTWALP TYNHLYKQI SNSTSGGSSN DNAYFGYSTP WGYFDFNRFH CHFSPRDWQR 300 LINNNWGFRP KRLNFKLFNI QVKEVTDNNG VKTIANNLTS TVQVFTDSY QLPYVLGSAH 360 EGCLPPFPAD VMIPQYGYL TLNDGSQAVG RSSFYCLEYF PSQMLRTGNN FQFSYEFENV 420 PFHSSY AHSQ SLDRLMNPLI DQYLYLSKT INGSCLPVAS CGQNQQTLKF SVAGPSNMAV 480 QGRNYIPGPS YRQQRVSTTV TQNNNSEFAW PGASSWALNG RNSLMNPGPA MASHKEGEDR 540 FFPLSGSLIF GKQGTGRDNV DADKVMITNE EEIKTTNPVA TESYGQVATN HQSAQAQAQT 600 GWVQNQGILP GMVWQDRDVY LQGPIWAKIP HTDGNFHPSP LMGGFGMKHP PPQILIKNTP 660 VPADPPTAFN KDKLNSFTIQ YSTGQVSVEI EWELQKENS K RWNPEIQYTS NYYKSNNVEF 720 AVNTEGVYSE PRPIGTRYLT RNL (SEQ ID NO:39)
AAV9 S454- Muscle1	Muscle1, ASSLNIA (SEQ ID NO:7) (454_455)	MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWALKPGAP QPKANQQHQD NARGLVLPGY KYLGPGNGLD 60 KGEPVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNPY LKYNHADA EF QERLKEDTSF GGNLGRAVFQ 120 AKKRLLLEPLG LVEEAAKTAP GKKRPVEQSP QEPDSSAGIG KSGAQPAKKR LNFGQTGDTE 180 SVPDPQPIGE PPAAPSGVGS LTMASGGGAP VADNNEGADG VGSSSGNWHC DSQWLGD RVI 240 TTSTRTWALP TYNHLYKQI SNSTSGGSSN DNAYFGYSTP WGYFDFNRFH CHFSPRDWQR 300 LINNNWGFRP KRLNFKLFNI QVKEVTDNNG VKTIANNLTS TVQVFTDSY QLPYVLGSAH 360 EGCLPPFPAD VMIPQYGYL TLNDGSQAVG RSSFYCLEYF PSQMLRTGNN FQFSYEFENV 420 PFHSSY AHSQ SLDRLMNPLI DQYLYLSKT INGSASSLNI AGQNQQTLKF SVAGPSNMAV 480 QGRNYIPGPS YRQQRVSTTV TQNNNSEFAW PGASSWALNG RNSLMNPGPA MASHKEGEDR 540 FFPLSGSLIF GKQGTGRDNV DADKVMITNE EEIKTTNPVA TESYGQVATN HQSAQAQAQT 600 GWVQNQGILP GMVWQDRDVY LQGPIWAKIP HTDGNFHPSP LMGGFGMKHP PPQILIKNTP 660 VPADPPTAFN KDKLNSFTIQ YSTGQVSVEI EWELQKENS K RWNPEIQYTS NYYKSNNVEF 720 AVNTEGVYSE PRPIGTRYLT RNL (SEQ ID NO:40)
AAV9 S454-Tfr1	Tfr1, HAIYPR (SEQ ID NO:106) (454_455)	MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWALKPGAP QPKANQQHQD NARGLVLPGY KYLGPGNGLD 60 KGEPVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNPY LKYNHADA EF QERLKEDTSF GGNLGRAVFQ 120 AKKRLLLEPLG LVEEAAKTAP GKKRPVEQSP QEPDSSAGIG KSGAQPAKKR LNFGQTGDTE 180 SVPDPQPIGE PPAAPSGVGS LTMASGGGAP VADNNEGADG VGSSSGNWHC DSQWLGD RVI 240 TTSTRTWALP TYNHLYKQI SNSTSGGSSN DNAYFGYSTP WGYFDFNRFH CHFSPRDWQR 300 LINNNWGFRP KRLNFKLFNI QVKEVTDNNG VKTIANNLTS TVQVFTDSY QLPYVLGSAH 360 EGCLPPFPAD VMIPQYGYL TLNDGSQAVG RSSFYCLEYF PSQMLRTGNN FQFSYEFENV 420 PFHSSY AHSQ SLDRLMNPLI DQYLYLSKT INGS HAIYPR HGQNQQTLKF SVAGPSNMAV 480 QGRNYIPGPS YRQQRVSTTV TQNNNSEFAW PGASSWALNG RNSLMNPGPA MASHKEGEDR 540 FFPLSGSLIF GKQGTGRDNV DADKVMITNE EEIKTTNPVA TESYGQVATN HQSAQAQAQT 600 GWVQNQGILP GMVWQDRDVY LQGPIWAKIP HTDGNFHPSP LMGGFGMKHP PPQILIKNTP 660 VPADPPTAFN KDKLNSFTIQ YSTGQVSVEI EWELQKENS K RWNPEIQYTS NYYKSNNVEF 720 AVNTEGVYSE PRPIGTRYLT RNL (SEQ ID NO:41)
AAV9 S454-Tfr3	Tfr3, RTIGPSV (SEQ ID NO:12) (454_455)	MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWALKPGAP QPKANQQHQD NARGLVLPGY KYLGPGNGLD 60 KGEPVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNPY LKYNHADA EF QERLKEDTSF GGNLGRAVFQ 120 AKKRLLLEPLG LVEEAAKTAP GKKRPVEQSP QEPDSSAGIG KSGAQPAKKR LNFGQTGDTE 180 SVPDPQPIGE PPAAPSGVGS LTMASGGGAP VADNNEGADG VGSSSGNWHC DSQWLGD RVI 240 TTSTRTWALP TYNHLYKQI SNSTSGGSSN DNAYFGYSTP WGYFDFNRFH CHFSPRDWQR 300 LINNNWGFRP KRLNFKLFNI QVKEVTDNNG VKTIANNLTS TVQVFTDSY QLPYVLGSAH 360 EGCLPPFPAD VMIPQYGYL TLNDGSQAVG RSSFYCLEYF PSQMLRTGNN FQFSYEFENV 420 PFHSSY AHSQ SLDRLMNPLI DQYLYLSKT INGSRTIGPS VGQNQQTLKF SVAGPSNMAV 480 QGRNYIPGPS YRQQRVSTTV TQNNNSEFAW PGASSWALNG RNSLMNPGPA MASHKEGEDR 540 FFPLSGSLIF GKQGTGRDNV DADKVMITNE EEIKTTNPVA TESYGQVATN HQSAQAQAQT 600 GWVQNQGILP GMVWQDRDVY LQGPIWAKIP HTDGNFHPSP LMGGFGMKHP PPQILIKNTP 660

Название капсида	Вставка или замена	Аминокислотная последовательность
		VPADPPTAFN KDKLNSFITQ YSTGQVSVEI EWELQKENS RWNPEIQYTS NYKSNNEF 720 AVNTEGVYSE PRPIGTRYLT RNL (SEQ ID NO:42)
AAV9 S454-Tfr4 (AAV9 S454- Tfr3C)	Tfr4, CRTIGPSV C (SEQ ID NO:13) (454_455)	MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWALKPGAP QPKANQQHQD NARGLVLPY KYLGPGNGLD 60 KGEPVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNPY LKYNHADA EF QERLKEDTSF GGNLGRAVFQ 120 AKKRLLEPLG LVEEAAKTAP GKKRPVEQSP QEPDSSAGIG KSGAQPAKKR LNFGQTGDTE 180 SVPDPQPIGE PPAAPSGVGS LTMASGGGAP VADNNEGADG VGSSSGNWHC DSQWLGD RVI 240 TTSTRTWALP TYNNHLYKQI SNSTSGGSSN DNAYFGYSTP WGYDFNRFH CHFSPRDWQR 300 LINNNWGFRP KRLNFKLFNI QVKEVTDNNG VKTIANNLTS TVQVFTDSY QLPYVLGSAH 360 EGCLPPFPAD VFMIPQYGYL TLNDGSQAVG RSSFYCLEYF PSQMLRTGNN FQFSYEFENV 420 PFHSSY AHSQ SLDRLMNPLI DQYLYLSKT INGS CRTIGP SVCGQNQQTL KFSVAGPSNMAV 482 QGRNYIPGPS YRQQRVSTTV TQNNSEFAW PGASSWALNG RNSLMNPGPA MASHKEGEDR 542 FFPLSGSLIF GKQGTGRDNV DADKVMITNE EEIKTTNPVA TESYGQVATN HQSAQAQAQT 602 GWVQNQGILP GMVWQDRDVY LQGPIWAKIP HTDGNFHPSP LMGGFGMKHP PPQILIKNTP 662 VPADPPTAFN KDKLNSFITQ YSTGQVSVEI EWELQKENS RWNPEIQYTS NYKSNNEF 722 AVNTEGVYSE PRPIGTRYLT RNL (SEQ ID NO:43)
AAV9.58 8Ad (9 588 Ad)	SITLVKST QTV (SEQ ID NO:14), DLC-AS1 (588_589)	MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWALKPGAP QPKANQQHQD NARGLVLPY KYLGPGNGLD 60 KGEPVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNPY LKYNHADA EF QERLKEDTSF GGNLGRAVFQ 120 AKKRLLEPLG LVEEAAKTAP GKKRPVEQSP QEPDSSAGIG KSGAQPAKKR LNFGQTGDTE 180 SVPDPQPIGE PPAAPSGVGS LTMASGGGAP VADNNEGADG VGSSSGNWHC DSQWLGD RVI 240 TTSTRTWALP TYNNHLYKQI SNSTSGGSSN DNAYFGYSTP WGYDFNRFH CHFSPRDWQR 300 LINNNWGFRP KRLNFKLFNI QVKEVTDNNG VKTIANNLTS TVQVFTDSY QLPYVLGSAH 360 EGCLPPFPAD VFMIPQYGYL TLNDGSQAVG RSSFYCLEYF PSQMLRTGNN FQFSYEFENV 420 PFHSSY AHSQ SLDRLMNPLI DQYLYLSKT INSGQNQQTL LKFSVAGPSN MAVQGRNYIP 480 GPSYRQQRVS TTVTQNNNSI TLVKSTQTVS EFAWPGASSW ALNGRNSLMN PGPMASHKE 540 GEDRFFPLSG SLIFGKQGTG RDNDADKVM ITNEEEIKTT NPVATESYGQ VATNHQSAQA 600 QAQTGWVQNG GILPGMVWQD RDVYLQGPW AKIPHTDGNF HPSPLMGGFG MKHPPQILI 660 KNTPVPADPP TAFNKDKLNS FITQYSTGQV SVEIEWELQK ENSKRWNPEI QYTSNYKSN 720 NVEFAVNTEG VYSEPRPIGT RYLTRNL (SEQ ID NO:44)
AAV9.58 8 Hep (9 588 Hep)	TILSRSTQ TG (SEQ ID NO:15), DLC-AS2, 588_589	MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWALKPGAP QPKANQQHQD NARGLVLPY KYLGPGNGLD 60 KGEPVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNPY LKYNHADA EF QERLKEDTSF GGNLGRAVFQ 120 AKKRLLEPLG LVEEAAKTAP GKKRPVEQSP QEPDSSAGIG KSGAQPAKKR LNFGQTGDTE 180 SVPDPQPIGE PPAAPSGVGS LTMASGGGAP VADNNEGADG VGSSSGNWHC DSQWLGD RVI 240 TTSTRTWALP TYNNHLYKQI SNSTSGGSSN DNAYFGYSTP WGYDFNRFH CHFSPRDWQR 300 LINNNWGFRP KRLNFKLFNI QVKEVTDNNG VKTIANNLTS TVQVFTDSY QLPYVLGSAH 360 EGCLPPFPAD VFMIPQYGYL TLNDGSQAVG RSSFYCLEYF PSQMLRTGNN FQFSYEFENV 420 PFHSSY AHSQ SLDRLMNPLI DQYLYLSKT INSGQNQQTL LKFSVAGPSN MAVQGRNYIP 480 GPSYRQQRVS TTVTQNNNTI LSRSTQTGSE FAWPGASSWA LNNGRNSLMN GPAMASHKEG 540 EDRFFPLSGS LIFGKQGTGR DNVDADKVM TNEEEIKTTN PVATESYGQV ATNHQSAQAQ 600 AQTGWVQNGQ ILPGMVWQDR DVYLQGPWA KIPHTDGNF PSPLMGGFGM KHPPQILIK 660 NTPVPADPPT AFNKDKLNSF ITQYSTGQVS VEIEWELQKE NSKRWNPEIQ YTSNYKSN 720 VEFAVNTEG VYSEPRPIGT RYLTRNL (SEQ ID NO:45)
AAVPHPeB.VP2Ad	SITLVKST QTV (SEQ ID NO:14), DLC-AS1 (138_139)	1 MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWALKPGAP QPKANQQHQD NARGLVLPY KYLGPGNGLD 61 KGEPVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNPY LKYNHADA EF QERLKEDTSF GGNLGRAVFQ 121 AKKRLLEPLG LVEEAAKT TI LSRSTQTGAP GKKRPVEQSP QEPDSSAGIG KSGAQPAKKR LNFGQTGDTE 191 SVPDPQPIGE PPAAPSGVGS LTMASGGGAP VADNNEGADG VGSSSGNWHC DSQWLGD RVI 251 TTSTRTWALP TYNNHLYKQI SNSTSGGSSN DNAYFGYSTP WGYDFNRFH CHFSPRDWQR 311 LINNNWGFRP KRLNFKLFNI QVKEVTDNNG VKTIANNLTS TVQVFTDSY QLPYVLGSAH 371 EGCLPPFPAD VFMIPQYGYL TLNDGSQAVG RSSFYCLEYF PSQMLRTGNN FQFSYEFENV 431 PFHSSY AHSQ SLDRLMNPLI DQYLYLSRT INSGQNQQTL LKFSVAGPSN MAVQGRNYIP

Название капсида	Вставка или замена	Аминокислотная последовательность
		491 GPSYRQQRVS TTVTQNNNSE FAWPGASSWA LNGRNSLMNP GPAMASHKEG EDRFFPLSGS 551 LIFGKQGTGR DNVDADKVM TNEEEIKTTN PVATESYGQV ATNHQSD DTL AVPFKAQAQT 611 GWVQNQGILP GMVWQDRDVY LQGPIWAKIP HTDGNFHPSP LMGGFGMKHP PPQILIKNTP 671 VPADPPTAFN KDKLNSFITQ YSTGQVSVEI EWELQKENS RWNPEIQYTS NYYKSNNVEF 731 AVNTEGVYSE PRPIGTRYLT RNL (SEQ ID NO:46)
AAVPHPeB.VP2H сгг	TILSRSTQ TG (SEQ ID NO:15), DLC-AS2, (138_139)	1 MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWALKPGAP QPKANQQHQD NARGLVLPGY KYLGPGNGLD 61 KGEPVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNPY LKYNHADA EF QERLKEDTSF GGNLGRAVFQ 121 AKKRILLEPLG LVEEAAKTSI TLVKSTQTV A PGKKRPVEQS PQEPDSSAGI GKSGAQPAKK RLNFGQTGDT E 192 SVPDPQPIGE PPAAPSGVGS LTMASGGGAP VADNNEGADG VGSSSGNWHC DSQWLGD RVI 252 TTSTRTWALP TYNNHLYKQI SNSTSGGSSN DNAYFGYSTP WGYFDNRFH CHFSPRDWQR 312 LINNNWGFRP KRLNFKLFNI QVKEVTDNNG VKTIANNLTS TVQVFTDSY QLPYVLGSAH 372 EGCLPPFPAD VFMIPQGYL TLNDGSQAVG RSSFYCLEYF PSQMLRTGNN FQFSYEFENV 432 PFHSSYAHSQ SLDRLMNPLI DQYLYLSRT INSGGQNQQT LKFSVAGPSN MAVQGRNYIP 492 GPSYRQQRVS TTVTQNNNSE FAWPGASSWA LNGRNSLMNP GPAMASHKEG EDRFFPLSGS 552 LIFGKQGTGR DNVDADKVM TNEEEIKTTN PVATESYGQV ATNHQSD DTL AVPFKAQAQT 612 GWVQNQGILP GMVWQDRDVY LQGPIWAKIP HTDGNFHPSP LMGGFGMKHP PPQILIKNTP 672 VPADPPTAFN KDKLNSFITQ YSTGQVSVEI EWELQKENS RWNPEIQYTS NYYKSNNVEF 732 AVNTEGVYSE PRPIGTRYLT RNL (SEQ ID NO:47)
AAV.rh.3 4	-	MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWDLKPGAP KPKANQQKQD DGRGLVLPGY EYLGPFNGLD KGEPVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNPY LRYNHADA EF QERLQEDTSF GGNLGRAVFQ AKKRVLLEPLG LVEEGAKTAP GKRRPLESPQ EPDSSSGIGK KGKQPAKKRL NFEEDTGAGD GPPEGSDTSA MSSDIEMRAA PGGNAVDAGQ GSDGVGNASG DWHC DSTWSE GKVT TTSTRT WVLP TYNNHL YLRLGTTSNS NTYNGFSTPW GYFDNRFHC HFSPRDWQRL INNNWGLRPK AMRVKIFNIQ VKEVTTSNGE TTVANNLTST VQIFADSSYE LPYVMDAGQE GSLPPFPNDV FMVPQYGYCG IVTGENQNQT DRNAFYCLEY FPSQMLRTGN NFETAYNFEK VPFHSMY AHS QSLDGLMNPL LDQYLWHLQS TTSGETLNQG NAATTFGKIR SGDFAFYRKN WLPGPCVKQQ RFSKTASQNY KIPASGGNAL LKYDTHYTLN NRWSNIAPGP PMATAGPSDG DFSNAQLIFP GPSVTGNTTT SANNLLFTSE EEIAATNPRD TDMFGQIADN NQNATTAPIT GNV TAMGVLP GMVWQNRDIY YQGPIWAKIP HADGHFHPSP LIGGFGLKHP PPQIFIKNTP VPAYPATFTT AARVDSFITQ YSTGQVAVQI EWEIEKERSK RWNPEVQFTS NCGNQSSMLW APDTTGKYTE PRVIGSRYLT NHL (SEQ ID NO:81)
AAV.hu.3 1	-	MAADGYLPDW LEDTLSEGIR QWWKLKPGPP PPKPAERHKD DSRGLVLPGY KYLGPGNGLD KGEPVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNPY LKYNHADA EF QERLKEDTSF GGNLGRAVFQ AKKRILLEPLG LVEEAAKTAP GKRRPVEQSP QEPDSSAGIG KSGSQPAKKK LNFGQTGDTE SVPDPQPIGE PPAAPSGVGS LTMASGGGAP VADNNEGADG VGSSSGNWHC DSQWLGD RVI TTSTRTWALP TYNNHLYKQI SNSTSGGSSN DNAYFGYSTP WGYFDNRFH CHFSPRDWQR LINNNWGFRP KRLNFKLFNI QVKEVTDNNG VKTIANNLTS TVQVFTDSY QLPYVLGSAH EGCLPPFPAD VFMIPQGYL TLNDGGQAVG RSSFYCLEYF PSQMLRTGNN FQFSYEFENV PFHSSYAHSQ SLDRLMNPLI DQYLYLSKT INSGGQNQQT LKFSVAGPSN MAVQGRNYIP GPSYRQQRVS TTVTQNNNSE FAWPGASSWA LNGRNSLMNP GPAMASHKEG EDRFFPLSGS LIFGKQGTGR DNVDADKVM TNEEEIKTTN PVATESYGQV ATNHQSAQAQ AQTGWVQNQG ILPGMVWQDR DVYLQGIWA KIPHTDGNFH PSPLMGGFGM KHPPPQILIK NTPVPADPPT AFNKDKLNSF ITQYSTGQVS VEIEWELQKE NSKRWNPEIQ YTSNYYKSNN VEFVSTEGV YSEPRPIGTR YLTRNL (SEQ ID NO:82)
AAV.rh.3 1	-	KAYDQQLKAG DNPYLRYNHA DAEFQERLQE DTSFGGNLGR AVFQAKKRVL EPLGLVETPA KTAPGKKRPV DSPDSTSGIG KKGQPAKKR LNFGQTGDSE SVPDPQPIGE PPAGPSGLGS GTMAAGGGAP MADNNEGADG VGNASGNWHC DSTWLGDRVI TTSTRTWALP TYNNHLYKQI SSQSAGSTND NVYFGYSTPW GYFDNRFHC HFSPRDWQRL INNNWGFRPK KLNFKLFNIQ

Название капсида	Вставка или замена	Аминокислотная последовательность
		VKEVTTNDGV TTIANNLTST VQVFSDEYQ LPYVLGSAHQ GCLPPFPADV FMIPQYGYLT LNNGSQSVGR SSFYCLEYFP SQMLRTGNNF TFSYTFEDVP FHSSYAHSQS LDRLMNPLID QYLYYLARTQ SNAGGTAGNR ELQFYQGGPT TMAEQAKNWL PGPCFRQQRV SKTLDQNNNS NFAWTGATKY HLNXRNSLVN PGVAMATHKD DEERFFPSSG VLIFGKTGAA NKTTLENVLM TNEEEIRPTN PVATEEYGIV SSNLQAATA AQTQVVNNQG ALPGMVWQNR DVYLQGPWA KIPHTDGNFH PSPLMGGFGL KHPPPQILIK NTPVPANPPE VFTPAKFASF ITQYSTGQVS VEIEWELQKE NSKRWNPEIQ YTSNFDKQTG VDFAVDSQGV YSEP (SEQ ID NO:83)
AAV. hu.12	-	MAADGYLPDW LEDTLSEGIR QWWKLKPGPP PPKPAERHQD DSRGLVLPGY KYLGPFNGLD KGEPVNEADA AALEHDKAYD RQLDSGDNPY LKYNHADA EF QERLKEDTSF GGNLGRAVFQ AKKRVLPLG LVEEPVK TAP GKKRPVEHSP VEPDSSSGTG KAGHQ PARKR LNFGQTGDAD SVPDPQLGQ PPAAPSLGS TTMATGSGAP MADNNEGADG VGNSSGNWHC DSQWLGD RVI TTSTRTWALP TYNNHLYKQI SSQSGASNDN HYFGYSTPWG YFDFNRFHCH FSPRDWQRLI NNNWGFRPKR LNFKLFIQV KEVTQNDGTT TIANNLTSTV QVFTDSEYQL PYVLGSAHQG CLPPFPADV MVPQYGYLTL NNGSQAVGRP SFYCLEYFPS QMLRTGNNFT FSYTFEDVPF HSSYAHSQSL DRLMNPLIDQ YLYLNRQTQS NSGTLQQSRL LFSQAGPTSM SLQAKNWLPG PCYRQRLSK QANDNNNSNF PWTAATKYHL NGRDSLVPNG PAMASHKDDE EKFFPMHGTL IFGKQGTNAN DADLEHVMIT DEEEIRTTNP VATEQYGNVS NNLQNSNTGP TTENVNHQGA LPGMVWQDRD VYLQGPWAK IPHTDGHFHP SPLMGGFGLK HPPQIMIKN TPVPANPTN FSSAKFASFI TQYSTGQVSV EIEWELQKEN SKRWNPEIQY TSNNKSVNV DFTVDITNGVY SEPRPIGTRY LTRNL (SEQ ID NO:84)
AAV.hu.1 3	-	MAADGYLPDW LEDTLSEGIR QWWKLKPGPP PPKPAERHKD DSRGLVLPGY KYLGPFNGLD KGEPVNEADA AALEHDKAYD RQLDSGDNPY LKYNHADA EF QERLKEDTSF GGNLGRAVFQ AKKRVLPLG LVEEPVK TAP GKKRPVEHSP AEPDSSSGTG KAGQ PARKR LNFGQTGDAD SVPDPQLGQ PPAAPSLGT NTMASGSGAP MADNNEGADG VGNSSGNWHC DSTWMGD RVI TTSTRTWALP TYNNHLYKQI SSQSGASNDN HYFGYSTPWG YFDFNRFHCH FSPRDWQRLI NNNWGFRPKR LNFKLFIQV KEVTQNDGTT TIANNLTSTV QVFTDSEYQL PYVLGSAHQG CLPPFPADV MVPQYGYLTL NNGSQAVGRS SFYCLEYFPS QMLRTGNNFT FSYTFEDVPF HSSYAHSQSL DRLMNPLIDQ YLYLSRTNT PSGTTTQSR L QFSQAGASDI RDQSRNWLPG PCYRQRVSK TSADNNNSEY SWTGATKYHL NGRDSLVPNG PAMASHKDDE EKFFQSGVL IFGKQSEKT NVDIEKVMIT DEEEIRTTNP VATEQYGSVS TNLQGGNTQA ATADVNTQGV LPGMVWQDRD VYLQGPWAK IPHTDGHFHP SPLMGGFGLK HPPQILIKN TPVPANPSTT FSAAKFASFI TQYSTGQVSV EIEWELQKEN SKRWNPEIQY TSNNKSVNV DFTVDITNGVY SEPRPIGTRY LTRNL (SEQ ID NO:85)
AAV.hu.2 1	-	MAADGYLPDW LEDTLSEGIR QWWKLKPGPP PPKPAERHKD DSRGLVLPGY KYLGPFNGLD KGEPVNEADA AALEHDKAYD RQLDSGDNPY LKYNHADA EF QERLKEDTSF GGNLGRAVFQ AKKRILEPLG LVEEPVK TAP GKKRPVEHSP AEPDSSSGTG KAGQ PARKR LNFGQTGDAD SVPDRPLGQ PPAAPSLGT NTMASGSGAP MADNNEGADG VGNSSGNWHC DSTWMGD RVI TTSTRTWALP TYNNHLYKQI SSQSGASNDN HYFGYSTPWG YFDFNRFHCH FSPRDWQRLI NNNWGFRPKR LSKLFIQV KEVTQNDGTT TIANNLTSTV QVFTDSEYQL PYVLGSAHQG CLPPFPADV MVPQYGYLTL NNGSQAVGRS SFYCLEYFPS QMLRTGNNFT FSYTFEDVPF HSSYAHSQSL DRLMNPLIDQ YLYLSRTNT PSGTTTMSRL QFSQAGASDI RDQSRNWLPG PCYRQRVSK TAADNNNSDY SWTGATKYHL NGRDSLVPNG PAMASHKDDE EKYFPQSGVL IFGKQDSGKT NVDIEKVMIT DEEEIRTTNP VATEQYGSVS TNLQSGNTQA ATSDVNTQGV LPGMVWQDRD VYLQGPWAK IPHTDGHFHP SPLMGGFGLK HPPQILIKN TPVPANPSTT FSAAKFASFI TQYSTGQVSV EIEWELQKEN SKRWNPEIQY TSNNKSVNV DFTVDITNGVY SEPRPIGTRY LTRNL (SEQ ID NO:77)
AAV.hu.2 6	-	MAADGYLPDW LEDTLSEGIR QWWKLKPGPP PPKPAERHKD DSRGLVLPGY KYLGPFNGLD KGEPVNEADA AALEHDKAYD RQLDSGDNPY LKYNHADA EF QERLKEDTSF GGNLGRAVFQ AKKRILEPLG LVEEPVK TAP GKKRPVEHSP AEPDSSSGTG KAGQ PARKR LNFGQTGDAD SVPDPQLGQ PPAAPSLGT NTMASGSGAP MADNNEGADG VGNSSGNWHC DSTWMGD RVI

Название капсида	Вставка или замена	Аминокислотная последовательность
		TTSTRTWALP TYNNHLYKQI SSQSGASNDN HYFGYSTPWG YDFNRFHCH FSPRDWQRLI NNNWGFRPKR LSFKLFNIQV KEVTQNDGTT TIANNLTSTV QVFTDSEYQL PYVLGSAHQG CLPPFPADV F MVPQYGYLTL NNGSQAVGRS SFYCLEYFPS QMLRTGNNFT FSYTFEDVPF HSSYAHSQSL DRLMNPLIDQ YLYYLSRTNT PSGTTTMSRL QFSQAGASDI RDQSRNWLPG PCYRQQRVSK TAADNNNSDY SWTGATKYHL NGRDSLVPNG PAMASHKDDE EKYPQSGVL IFGKQDSGKT NVDIEKVMIT DEEEIRTTNP VATEQYGSVS TNLQSGNTQA ATSDVNTQGV LPGMVWQDRD VYLQGPWAK IPHTDGHFHP SPLMGGFGLK HPPQILIKN TPVPANPSTT FSAAKFASFI TQYSTGQSVS EIEWELQKEN SKRWNPEIQY TSNYNKSVNV DFTVDITNGVY SEPRPIGTRYLTRNL (SEQ ID NO:79)
AAV.hu.5 3	-	MAADGYLPDW LEDTLSEGIR QWWKLKPGPP PPKPAERHKD DSRGLVLPGY KYLGPFNGLD KGEPVNEADA AALEHDKAYD RQLDSGDNPY LKYNHADA EF QERLKEDTSF GGNLGRAVFQ AKKRVLPLG LVEEPVK TAP GKKRPVEHSP AEPDSSSGTG KAGQQPARKR LNFGQTGDAD SVPDPQPLRQ PPAAPTSLSG TTMATGSGAP MADNNEGADG VGNSSGNWHC DSQWLGD RVI TTSTRTWALP TYNNHLYKQI SSQSGASNDN HYFGYSTPWG YDFNRFHCH FSPRDWQRLI NNNWGFRPKR LNFKLFNIQV KEVTQNDGTT TIANNLTSTV QVFTDSEYQL PYVLGSAHQG CLPPFPADV F MVPQYGYLTL NNGSQAVGRS SFYCLEYFPS QMLRTGNNFQ FSYTFEDVPF HSSYAHSQSL DRLMNPLIDQ YLYYLNRTQT ASGTQQSRLL FSQAGPTSMS LQAKNWLPGP CYRQQLSKQ ANDNNNSNFP WTGATKY YLN GRDSLVPNGP AMASHKDDEE KFFPMHGTLI FGKEGTNATN AELENVMITD EEEIRTTNPV ATEQYGYVSN NLQNSNTAAS TETVNHQ GAL PGMVWQDRDV YLQGPWAKI PHTDGHFHPS PLMGGFGLKH PPPQIMIKNT PVPANPPTNF SSAKFASFIT QYSTGQVSVE IEWELQKENS KRWNPEIQYT SNYNKSVNV DFTVDITNGVYS EPRPIGTRYLTRNL (SEQ ID NO:80)
AAV.hu.5 6	-	MAADGYLPDW LEDTLSEGIR QWWKLKPGPP PPKPAERHKD DSRGLVLPGY KYLGPFNGLD KGEPVNEADA AALEHDKAYD RQLDSGDNPY LKYNHADA EF QERLKEDTSF GGNLGRAVFQ AKKRVLPLG LVEEPVK TAP GKKRPVEHSP VEPDSSSGTG KAGNQPARKR LNFGQTGDAD SVPDPQPLGQ PPASPSGLGT NTMATGSGAP MADNNEGADG VGNSSGNWHC DSTWMGDRVV TTSTRTWALP TYNNHLYKQI SSQSGASNDN HYFGYSTPWG YDFNRFHCH FSPRDWQRLI NNNWGFRPKR LNFKLFNIQV KEVTQNDGTT TIANNLTSTV QVFTDSEYQL PYVLGSAHQG CLPPFPADV F MVPQYGYLTL NNGSQAVGRS SFYCLEYFPS QMLRTGNNFT FSYTFEDVPF HSSYAHSQSL DRLMNPLIDQ YLYYLSRTNT PSGTTTQSRLL QFSQAGASDI RDQSRNWLPG PCYRQQRVSK TAADNNNSEY SWTGATKYHL NGRDSLVPNG PAMASHKDDE EKFPQSGVL IFGKQSGEKT NVDIEKVMIT DEEEIRTTNP VATEQYGSVS TNLQSGNTQA ATSDVNTQGV LPGMVWQDRD VYLQGPWAK IPHTDGHFHP SPLMGGFGLK HPPQILIKN TPVPANPSTT FSAAKFASFI TQYSTGQSVS EIEWELQKEN SKRWNPEIQY TSNYNKSVNV DFTVDITNGVY SEPRPIGTRYLTRNL (SEQ ID NO:86)
AAV.rh.2 4	-	MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWDLKPGAP KPKANQQKQD DGRGLVLPGY KYLGPFNGLD KGEPVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNPY LRYNHADA EF QERLQEDTSF GGNLGRAVFQ AKKRVLPLG LVEEGAKTAP GKKRPIESPD SSTGIGKKGQ QPAKKKL NFG QTGDSESPD PQPIGEPPAG PSGLGSGTMA AGGGAPMADN NEGADGVGSS SGNWHCDSTW LGDRVITST RTWALPTYNN HLYKQISNGT SGGSTNDNTY FGYSTPWGYF DFNRFHCHFS PRDWQRLINN NWGFRPKRLN FKLFIQVKE VTQNEGTKTI ANNLTSTIQV FTDSEYQLPY VLGSAHQGCL PPFPADV FMI PQYGYLTLNN GSQAVGRSSF YCLEYFPSQM LRTGNNFEFS YQFEDVPFHS SYAHSQSLDR LMNPLIDQYL YYLSRTQSTG GTAGTQQLLF SQAGPNNMSA QAKNWLPGPC YRQQRVSTTV SQNNNSNFAW TGATKYHLNG RDSLVPNGVA MATHKGDEER FFPSSGVLMF GKQAGKDNV DYSSVMLTSE EEIKTTNPVA TEQYGVVADN LQQQNAAPIV GAVNSQ GALP GMVWQNRDVY LQGPWAKIP HTDGNFHPSP LMGGFGLKHP PPQILIKNT VPADPTTFS QAKLASFITQ YSTGQVSVEI EWELQKENS KRWNPEIQYTS NYYKSTNVDF AVNTEGTYSE PRPIGTRYLTRNL (SEQ ID NO:87)
AAV.hu.3 8	-	MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWDLKPGAP KPKANQQKQD DGRGLVLPGY KYLGPFNGLD KGEPVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNPY LRYNHADA EF QERLQEDTSF GGNLGRAVFQ

Название капсида	Вставка или замена	Аминокислотная последовательность
		AKKRVLEPLG LVEEAAKTAP GKKRPVEPSP QRSPDSSTGI GKKGQQPAKK RLNFGQTGDS ESVPDPQPIG EPPAGPSGLG SGTMAAGGGA PMADNNEGAD GVGSSSGNWH CDSTWLGDREV ITTSTRTWAL PTYNNHLYKQ ISNGTSGGST NDNTYFGYST PWGYFDNRF HCHFSRWDQ RLINNNWGFR PKRSLFKLFN IQVKEVTQNE GTKTIANNLT STIQVFTDSE YQLPYVLGSA HQGCLPPFPA DVFMIPQYGY LTLNNGSQAV GRSSFYCLEY FPSQMLRTGN NFEFSYTFED VPFHSSYAH QSLDRLMNPL IDQYLYLSR TQSTGGTQGT QQLLFSQAGP ANMSAQAKNW LPGPCYRQQR VSTTSLQNNN SNFAWTGATK YHLNGRDSL V NPGVAMATHK DDEERFFPSS GVL MFGKQGA GRDNVDYSSV MLTSEEEIKT TNPVATEQYG VVADNLQQTN TGPIVGNVNS QGALPGMVWQ NRDVYLQGPI WAKIPHTDGN CHPSPLMGGF GLKHPPPQIL IKNTVPVADP PTTFSQAKLA SFITQYSTGQ VSVEIEWELQ KENSKRWNP IQYTSNYYKS TNVDFAVNTE GTYSEPRPIG TRYLTRNL (SEQ ID NO:88)
AAV.rh.7 2	-	MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWDLKPGAP KPKANQQKQD DGRGLVLPGY KYLGPFNGLD KGEPVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNPY LRYNHADA EF QERLQEDTSF GGNLGRAVFQ AKKRVLEPLG LVEEAAKTAP GKKRPVEPSP QRSPDSSTGI GKKGQQPAKK RLNFGQTGDS ESVPDPQPIG EPPAGPSGLG SGTMAAGGGA PMADNNEGAD GVGSSSGNWH CDSTWLGDREV ITTSTRTWAL PTYNNHLYKQ ISNGTSGGST NDNTYFGYST PWGYFDNRF HCHFSRWDQ RLINNNWGFR PKRSLFKLFN IQVKEVTQNE GTKTIANNLT STIQVFTDSE YQLPYVLGSA HQGCLPPFPA DVFMIPQYGY LTLNNGSQAV GRSSFYCLEY FPSQMLRTGN NFEFSYTFED VPFHSSYAH QSLDRLMNPL IDQYLYLSR TQSTGGTQGT QQLLFSQAGP ANMSAQAKNW LPGPCYRQQR VSTTSLQNNN SNFAWTGATK YHLNGRDSL V NPGVAMATHK DDEERFFPSS GVL MFGKQGA GRDNVDYSSV MLTSEEEIKT TNPVATEQYG VVADNLQQTN TGPIVGNVNS QGALPGMVWQ NRDVYLQGPI WAKIPHTDGN FHPSPLMGGF GLKHPPPQIL IKNTVPVADP PTTFSQAKLA SFITQYSTGQ VSVEIEWELQ KENSKRWNP IQYTSNYYKS TNVDFAVNTE GTYSEPRPIG TRYLTRNL (SEQ ID NO:89)
AAV.cy.5	-	MAADGYLPDW LEGNLSEGIR EWWDLKPGAP KPKANQQKQD DGRGLVLPGY RYLGPFNGLD KGEPVNEADA AALEHDKAYD KQLEQGDNPY LKYNHADA EF QERLQEDTSF GGNLGRAVFQ AKKRVLEPLG LVEEAKTAP GKKRPIESPD SSTGIGKNGQ PPAKKKL NFG QTGDSESPD PQPLGEPPAA PSGLSGTMA AGGGAPMADN NEGADGVGNA SGNWHCDSTW LGDRVITTST RTWALPTYNN HLYKQISSQS GATNDNHFFG YSTPWGYFDF NRFHCHFSR DWQRLINNNW GFRPRKLRFK LFNIQVKEVT TNDGVTTIAN NLTSTIQVFS DSEYQLPYVL GSAHQGCLPP FPADVFMIPQ YGYLTLNNGS QSVGRSSFYC LEYFPSQMLR TGDNFEFSYT FEEVPFHSSY AHSQSLDRLM NPLIDQYLYY LARTQSTTGS TRELQFHQAG PNTMAEQSKN WLPGPCYRQQ RLSKNIDSNN NSNFAWTGAT KYHLNGRNSL TNPVAMATN KDDQFFPI NGVLVFGKTG AANKTTLENV LMTSEEEIKT TNPVATEEYG VVSSNLQSST AGPQTQTVNS QGALPGMVWQ NRDVYLQGPI WAKIPHTDGN FHPSPLMGGF GLKHPPPQIL IKNTVPANP PEVFTPAKFA SFITQYSTGQ VSVEIEWELQ KENSKRWNP IQYTSNYAKS NNVEFAVNNE GVYTEPRPIG TRYLTRNL (SEQ ID NO:90)
AAV.cy.6	-	MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWDLKPGAP KPKANQQKQD DGRGLVLPGY KYLGPFNGLD KGEPVNEADA AALEHDKAYD KQLEQGDNPY LKYNHADA EF QERLQEDTSF GGNLGRAVFQ AKKRVLEPLG LVEEAKTAP GKKRPIESPD SSTGIGKKGQ QPAKKKL NFG QTGDSESPD PQPLGEPPAA PSGLSGTMA AGGGAPMADN NEGADGVGNA SGNWHCDSTW LGDRVITTST RTWALPTYNN HLYKQISSQS GATNDNHFFG YSTPWGYFDF NRFHCHFSR DWQRLINNNW GFRPRKLRFK LFNIQVKEVT TNDGVTTIAN NLTSTIQVFS DSEYQLPYVL GSAHQGCLPP FPADVFMIPQ YGYLTLNNGS QSMGRSSFYC LEYFPSQMLR TGNNEFSYT FEEVPFHSSY AHSQSLDRLM NPLIDQYLYY LARTQSTTGS TRELQFHQAG PNTMAEQSKN WLPGPCYRQQ RLSKNIDSNN NSNFAWTGAT KYHLNGRNSL TNPVAMATN KDEQFFPI NGVLVFGKTG AANKTTLENV LMTSEEEIKT TNPVATEEYG VVSSNLQSST AGPQTQTVNS QGALPGMVWQ NRDVYLQGPI WAKIPHTDGN FHPSPLMGGF GLKHPPPQIL IKNTVPANP PGVFTPALFA SFITQYSTGQ VSVEIEWELQ KENSKRWNP IQYTSNYAKS NNVEFAVNNE GVYTEPRPIG TRYLTRNL (SEQ ID NO:91)

Название капсида	Вставка или замена	Аминокислотная последовательность
AAV.rh.4 6	-	MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWDLKPGAP KPKANQQKQD DGRGLVLPGY KYLGPFNGLD KGEPVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNPY LRYNHADAEF QERLQEDTSF GGNLGRAVFQ AKKRVLPLG LVEEGAKTAP GKKRPVEPSP QRSPDSSTGI GKKGQQPARK RLNFGQTGDS ESVPDPQPIG EPPAAPSSVG SGTMAAGGGA PMADNNEGAD GVGSSSGNWH CDSTWLGDRV ITTSTRTWAL PTYNNHLYKQ ISNGTSGGST NDNTYFGYST PWGYFDNRF HCHFSPRDWQ RLINNNWGFR PKRLSFKLFN IQVKEVTQNE GTKTIANNLT STIQVFTDSE YQLPYVLGSA HQGCLPPFPA DVFMIPQYGY LTLNNGSQAV GRSSFYCLEY FPSQMLRTGN NFSFSYTFED VPFHSSYAHS QSLDRLMNPL IDQYLYLSR TQSTGGTAGT QQLFSQAGP SNMSAQARNW LPGPCYRQQR VSTTSLQNNN SNFAWTGATK YHLNGRDSL V NPGVAMATNK DEDRFFPSS GILMFGKQGA GKDNVDYSNV MLTSEEEIKA TNPVATEQYG VVADNLQQQN TAPIVGAVNS QGALPGMVWQ NRDVYLQGP WAKIPHTDGN FHPSPLMGGF GLKHPPPQIL IKNTVPVADP PTAFNQAKLN SFITQYSTGQ VSVEIEWELQ KENSKRWNP IQYTSNYYKS TNVDFAVNTE GVYSEPRPIG TRYLTRNL (SEQ ID NO:92)
AAV.rh.2	-	MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWDLKPGAP KPKANQQKQD DGRGLVLPGY KYLGPFNGLD KGEPVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNPY LRYNHADAEF QERLQEDTSF GGNLGRAVFQ AKKRVLPLG LVEEGAKTAP GKKRPVEPSP QRSPDSSTGI GKKGHQPARK RLNFGQTGDS ESVPDPQPIG EPPAGPSGLG SGTMAAGGGA PMADNNEGAD GVGSSSGNWH CDSTWLGDRV ITTSTRTWAL PTYNNHLYKQ ISNGTSGGST NDNTYFGYST PWGYFDNRF HCHFSPRDWQ RLINNNWGFR PKRLNFKLFN IQVKEVTQNE GTKTIANNLT STIQVFTDSE YQLPYVPGSA HQGCLPPFPA DVFMIPQYGY LTLNNGSQAV GRSSFYCLEY FPSQMLRTGN NFEFSYTFED VPFHSSYAHS QSLDRLMNPL IDQYLYLSR TQSTGGTQGT QQLFSQAGP ANMSAQAKNW LPGPCYRQQR VSTTSLQNNN SNFAWTGATK YHLNGRDSL V NPGVAMATHK DDEERFFPSS GVL MFGKQGA GKDNVDYSSV MLTSEEEIKT TNPVATEQYG VVADNLQQTN GAPIVGTVNS QGALPGMVWQ NRDVYLQGP WAKIPHTDGN FHPSPLMGGF GLKHPPPQIL VKNTVPVADP PTTFSQAKLA SFITQYSTGQ VSVEIEWELQ KENSKRWNP IQYTSNYYKS TNVDFAVNTE GTYSEPRPIG TRYLTRNL (SEQ ID NO:93)
Rh.64R1		MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWDLKPGAP KPKANQQKQD DGRGLVLPGY KYLGPFGNGLD KGEPVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNPY LRYNHADAEF QERLQEDTSF GGNLGRAVFQ AKKRVLPLG LVEEGAKTAP GKKRPVEPSP QRSPDSSTGI GKKGQQPARK RLNFGQTGDS ESVPDPQPIG EPPAAPSSVG SGTMAAGGGA PMADNNEGAD GVGSSSGNWH CDSTWLGDRV ITTSTRTWAL PTYNNHLYKQ ISNGTSGGST NDNTYFGYST PWGYFDNRF HCHFSPRDWQ RLINNNWGFR PKRLSFKLFN IQVKEVTQNE GTKTIANNLT STIQVFTDSE YQLPYVLGSA HQGCLPPFPA DVFMIPQYGY LTLNNGSQAV GRSSFYCLEY FPSQMLRTGN NFSFSYTFED VPFHSSYAHS QSLDRLMNPL IDQYLYLSR TQSTGGTAGT QQLFSQAGP SNMSAQARNW LPGPCYRQQR VSTTSLQNNN SNFAWTGATK YHLNGRDSL V NPGVAMATNK DEDRFFPSS GILMFGKQGA GKDNVDYSNV MLTSEEEIKT TNPVATEQYG VVADNLQQQN TAPIVGAVNS QGALPGMVWQ NRDVYLQGP WAKIPHTDGN FHPSPLMGGF GLKHPPPQIL IKNTVPVADP PTAFNQAKLN SFITQYSTGQ VSVEIVWELQ KENSKRWNP IQYTSNYYKS TVDFAVNTE GVYSEPRPIG TRYLTRNL (SEQ ID NO:107)

7. Эквиваленты

[00247] Хотя это изобретение подробно описано со ссылкой на его конкретные варианты осуществления, следует понимать, что варианты, которые функционально эквивалентны, входят в объем настоящего изобретения. Действительно, различные модификации

изобретения в дополнение к продемонстрированным или описанным в данном документе станут очевидными для специалистов в данной области техники из приведенного выше описания и сопроводительных графических материалов. Предполагается, что такие модификации подпадают под объем прилагаемой формулы изобретения. Специалисты в данной области техники распознают или смогут установить, используя не более чем рутинные эксперименты, множество эквивалентов конкретным вариантам осуществления настоящего изобретения, описанным в данном документе. Предусмотрено, что такие эквиваленты охватываются следующими пунктами формулы изобретения.

[00248] Все публикации, патенты и патентные заявки, упомянутые в этом описании, включены в данное описание посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент или патентная заявка были специально и отдельно указаны для включения в настоящее описание посредством ссылки во всей их полноте.

[00249] Приведенное в данном документе обсуждение обеспечивает лучшее понимание природы проблем, стоящих перед данной областью техники, и никоим образом не должно толковаться как признание предшествующего уровня техники, равно как и цитирование какой-либо ссылки в данном документе не должно толковаться как признание того, что такая ссылка представляет собой «предшествующий уровень техники» для настоящей заявки.

[00250] Все ссылки, включая патентные заявки и публикации, процитированные в данном документе, включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте и для всех целей в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент или патентная заявка были специально и отдельно указаны для включения посредством ссылки во всей своей полноте для всех целей. Многие модификации и вариации настоящего изобретения могут быть выполнены без отклонения от его сущности и объема, как будет очевидно специалистам в данной области техники. Описанные в данном документе конкретные варианты осуществления предлагаются только в качестве примера, и изобретение должно быть ограничено только условиями прилагаемой формулы изобретения вместе с полным объемом эквивалентов, на которые эта формула изобретения имеет право.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ доставки трансгена в клетку ткани глаза, включающий приведение указанной клетки в контакт с вектором гAAV, содержащим трансген, кодирующий терапевтическое средство для лечения глазного заболевания, функционально связанный с одним или большим количеством регуляторных элементов, которые стимулируют экспрессию терапевтического средства для лечения глазного заболевания в клетке ткани глаза, при этом гAAV имеет капсид AAV1 (SEQ ID NO: 59); AAV2 (SEQ ID NO:60); AAV3 (SEQ ID NO:61); AAV3B (SEQ ID NO:74); AAV4 (SEQ ID NO:62); AAV5 (SEQ ID NO:63); AAV6 (SEQ ID NO:64); AAV7 (SEQ ID NO:65); AAV8 (SEQ ID NO:66); AAV9 (SEQ ID NO:67); AAV9e (SEQ ID NO:68); AAVrh.10 (SEQ ID NO:69); AAVrh.20 (SEQ ID NO:70); AAVhu.37 (SEQ ID NO:71); AAVrh39 (SEQ ID NO:73); AAV rh73 (SEQ ID NO:75); AAVrh.74 (SEQ ID NO:72 или SEQ ID NO:96); AAVhu.51 (SEQ ID NO:76); AAVhu.21 (SEQ ID NO:77); AAVhu.12 (SEQ ID NO:78); AAVhu.26 (SEQ ID NO:79); AAVrh.24 (SEQ ID NO:87); AAVhu.38 (SEQ ID NO:88); AAVrh.72 (SEQ ID NO:89); AAVhu.56 (SEQ ID NO:86); AAVcy.5 (SEQ ID NO:90); AAVcy.6 (SEQ ID NO:91); AAVrh.46 (SEQ ID NO:92); AAVrh.13 (SEQ ID NO:85); AAVrh.64.R1 (SEQ ID NO:107); AAV9.S454-TFR3 (SEQ ID NO: 42); AAV8.BBB (SEQ ID NO: 26); AAV8.BBB.LD (SEQ ID NO:27); AAV8.Y703F (замена Y703F в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 66, нумерацию см. на Фиг. 7); AAV9.Y443F (замена Y443F в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 67, нумерацию см. на Фиг. 7); или AAV9.Y6F (замена Y6F в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:66, нумерацию см. на Фиг. 7).

2. Способ доставки трансгена в ткань глаза или клетку-мишень ткани глаза или ее клеточный матрикс у субъекта, нуждающегося в этом, при этом указанный способ включает введение указанному субъекту вектора гAAV, содержащего трансген, кодирующий терапевтическое средство для лечения глазного заболевания, функционально связанный с одним или большим количеством регуляторных элементов, которые стимулируют экспрессию терапевтического средства для лечения глазного заболевания в клетке ткани глаза, при этом гAAV имеет капсид AAV1 (SEQ ID NO: 59); AAV2 (SEQ ID NO:60); AAV3 (SEQ ID NO:61); AAV3B (SEQ ID NO:74); AAV4 (SEQ ID NO:62); AAV5 (SEQ ID NO:63); AAV6 (SEQ ID NO:64); AAV7 (SEQ ID NO:65); AAV8 (SEQ ID NO:66); AAV9 (SEQ ID NO:67); AAV9e (SEQ ID NO:68); AAVrh.10 (SEQ ID NO:69); AAVrh.20 (SEQ ID NO:70); AAVhu.37 (SEQ ID NO:71); AAVrh39 (SEQ ID NO:73); AAV rh73 (SEQ ID NO:75); AAVrh.74 (SEQ ID NO:72 или SEQ ID NO:96); AAVhu.51 (SEQ ID NO:76); AAVhu.21 (SEQ ID NO:77); AAVhu.12 (SEQ ID NO:78); AAVhu.26 (SEQ ID NO:79);

AAVrh.24 (SEQ ID NO:87); AAVhu.38 (SEQ ID NO:88); AAVrh.72 (SEQ ID NO:89); AAVhu.56 (SEQ ID NO:86); AAVcy.5 (SEQ ID NO:90); AAVcy.6 (SEQ ID NO:91); AAVrh.46 (SEQ ID NO:92); AAVrh.13 (SEQ ID NO:85); AAVrh.64.R1 (SEQ ID NO:107); AAV9.S454-TFR3 (SEQ ID NO: 42); AAV8.BBB (SEQ ID NO: 26); AAV8.BBB.LD (SEQ ID NO:27); AAV8.Y703F (замена Y703F в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:66, нумерацию см. на Фиг. 7 для нумерации); AAV9.Y443F (замена Y443F в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:67, нумерацию см. на Фиг. 7); или AAV9.Y6F (замена Y6F в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:66, нумерацию см. на Фиг. 7).

3. Способ по п. 1 или 2, отличающийся тем, что капсид представляет собой капсид AAV3B серотипа, AAVrh.73 серотипа, AAV.hu.26 серотипа, AAVhu.51, AAVrh64R1 серотипа или капсид AAV9.S454.TFR3.

4. Способ по любому из пп. 1-3, отличающийся тем, что ткань глаза или клетка-мишень ткани глаза представляет собой ткань или клетку роговицы, ткань или клетку радужной оболочки, ткань или клетку цилиарного тела, ткань или клетку шлеммова канала, ткань или клетку трабекулярной сети, ткань или клетку сетчатки, ткань или клетку RPE-хориоидальной оболочки или клетку зрительного нерва.

5. Способ по п. 4, отличающийся тем, что ткань глаза или клетка-мишень ткани глаза представляет собой ткань или клетку сетчатки, или ткань или клетку RPE-хориоидальной оболочки.

6. Способ по п. 5, отличающийся тем, что капсид представляет собой капсид AAV3B или AAVrh.73.

7. Способ по пп. 1-6, отличающийся тем, что глазное заболевание представляет собой неинфекционный увеит.

8. Способ по пп. 1-4, отличающийся тем, что глазное заболевание представляет собой глаукому.

9. Способ по п. 8, отличающийся тем, что указанный rAAV нацелен на трабекулярную сеть и/или шлеммов канал.

10. Способ по пп. 8 или 9, отличающийся тем, что капсид представляет собой капсид AAV1, капсид AAV2, AAV7, капсид AAV3B, капсид AAV.hu.26 или капсид AAV9.S454-TFR3.

11. Способ по любому из пп. 1-10, отличающийся тем, что указанный вектор rAAV вводят интравитреально, супрахориоидально или внутрикамерно.

12. Способ по любому из пп. 1-10, отличающийся тем, что указанный вектор rAAV вводят системно.

13. Способ по любому из пп. 1-12, отличающийся тем, что указанный вектор

гAAV вводят в отсутствие гиалуроновой кислоты.

14. Фармацевтическая композиция для применения для доставки трансгена в клетку ткани глаза, при этом указанная композиция содержит вектор гAAV, содержащий трансген, кодирующий терапевтическое средство для лечения глазного заболевания, функционально связанный с одним или большим количеством регуляторных элементов, которые стимулируют экспрессию терапевтического средства для лечения глазного заболевания в клетке ткани глаза, при этом гAAV имеет капсид AAV1 (SEQ ID NO: 59); AAV2 (SEQ ID NO:60); AAV3 (SEQ ID NO:61); AAV3B (SEQ ID NO:74); AAV4 (SEQ ID NO:62); AAV5 (SEQ ID NO:63); AAV6 (SEQ ID NO:64); AAV7 (SEQ ID NO:65); AAV8 (SEQ ID NO:66); AAV9 (SEQ ID NO:67); AAV9e (SEQ ID NO:68); AAVrh.10 (SEQ ID NO:69); AAVrh.20 (SEQ ID NO:70); AAVhu.37 (SEQ ID NO:71); AAVrh39 (SEQ ID NO:73); AAVrh73 (SEQ ID NO:75); AAVrh.74 (SEQ ID NO:72 или SEQ ID NO:96); AAVhu.51 (SEQ ID NO:76); AAVhu.21 (SEQ ID NO:77); AAVhu.12 (SEQ ID NO:78); AAVhu.26 (SEQ ID NO:79); AAVrh.24 (SEQ ID NO:87); AAVhu.38 (SEQ ID NO:88); AAVrh.72 (SEQ ID NO:89); AAVhu.56 (SEQ ID NO:86); AAVcy.5 (SEQ ID NO:90); AAVcy.6 (SEQ ID NO:91); AAVrh.46 (SEQ ID NO:92); AAVrh.13 (SEQ ID NO:85); AAVrh.64.R1 (SEQ ID NO:107); AAV9.S454-TFR3 (SEQ ID NO: 42); AAV8.BBB (SEQ ID NO: 26); AAV8.BBB.LD (SEQ ID NO:27); AAV8.Y703F (замена Y703F в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:66, нумерацию см. на Фиг. 7 для нумерации); AAV9.Y443F (замена Y443F в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:67, нумерацию см. на Фиг. 7); или AAV9.Y6F (замена Y6F в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:66, нумерацию см. на Фиг. 7).

15. Фармацевтическая композиция по п. 14, отличающаяся тем, что капсид представляет собой капсид AAV3B серотипа, AAVrh.73 серотипа, AAVhu.26 серотипа, AAVhu.51, AAVrh64R1 серотипа или капсид AAV9.S454.TFR3.

16. Фармацевтическая композиция по п. 14 или 15, отличающаяся тем, что ткань глаза или клетка-мишень ткани глаза представляет собой ткань или клетку роговицы, ткань или клетку радужной оболочки, ткань или клетку цилиарного тела, ткань или клетку шлеммова канала, ткань или клетку трабекулярной сети, ткань или клетку сетчатки, ткань или клетку RPE-хориоидальной оболочки или клетку зрительного нерва.

17. Фармацевтическая композиция по п. 16, отличающаяся тем, что ткань глаза или клетка-мишень ткани глаза представляет собой ткань или клетку сетчатки, или ткань или клетку RPE-хориоидальной оболочки.

18. Фармацевтическая композиция по п. 17, отличающаяся тем, что капсид представляет собой капсид AAV3B или AAVrh.73.

19. Фармацевтическая композиция по пп. 14-18, отличающаяся тем, что глазное

заболевание представляет собой неинфекционный увеит.

20. Фармацевтическая композиция по пп. 14-18, отличающаяся тем, что глазное заболевание представляет собой глаукому.

21. Фармацевтическая композиция по п. 20, отличающаяся тем, что указанный гAAV нацелен на трабекулярную сеть и/или шлеммов канал.

22. Фармацевтическая композиция по пп. 20 или 21, отличающаяся тем, что капсид представляет собой капсид AAV3B серотипа, AAVrh.73 серотипа, AAV.hu.26 серотипа, AAVhu.51, AAVrh64R1 серотипа или капсид AAV9.S454.TFR3.

23. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 14-22, отличающаяся тем, что указанный вектор гAAV вводят интравитреально, супрахориоидально или внутрикамерно.

24. Способ по любому из пп. 14-22, отличающийся тем, что указанный вектор гAAV вводят системно.

25. Способ по п. 14-24, отличающийся тем, что указанный вектор гAAV вводят в отсутствие гиалуроновой кислоты.

26. Способ или фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-25, отличающиеся тем, что гAAV проявляет по меньшей мере в 1,1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 раз большую трансдукцию в ткани-мишени по сравнению с эталонным капсидом AAV.

27. Способ или фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-26, отличающиеся тем, что относительное содержание трансгенной РНК в 1,1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 раз больше в ткани-мишени по сравнению с количеством трансгенной РНК из эталонного капсида AAV.

28. Способ или фармацевтическая композиция по пп. 26 или 27, отличающиеся тем, что эталонный капсид AAV представляет собой AAV2, AAV8 или AAV9.

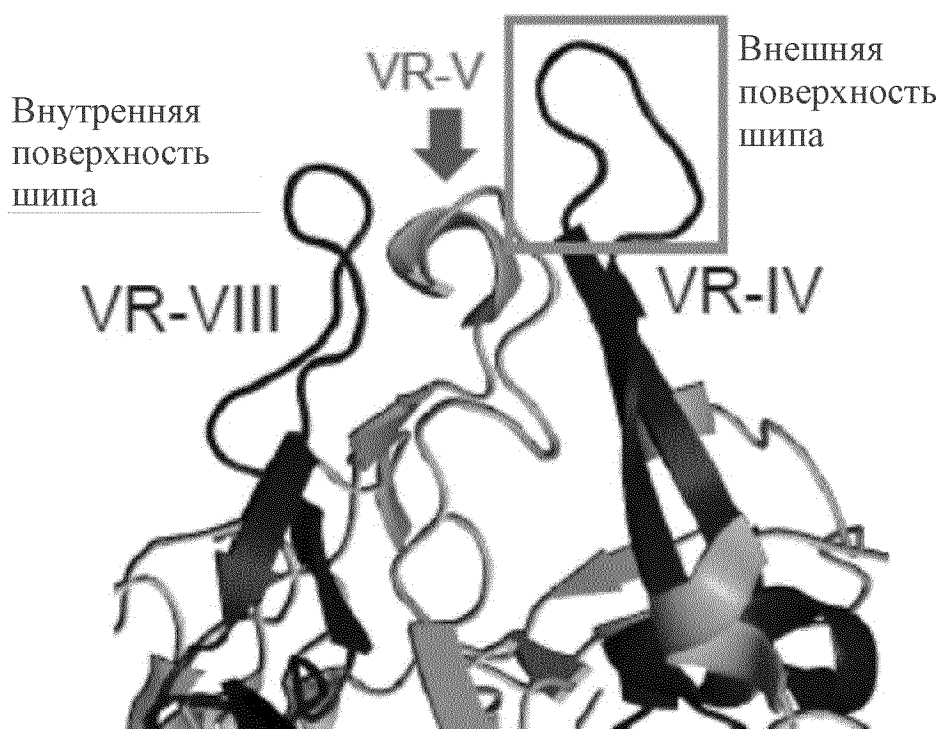
29. Способ лечения глазного заболевания или нарушения у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции по любому из пп. 14-22 или 25.

30. Нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую капсидный белок гAAV по любому из вышеуказанных пунктов, или кодирующую аминокислотную последовательность, имеющую с ней по меньшей мере 80% идентичности.

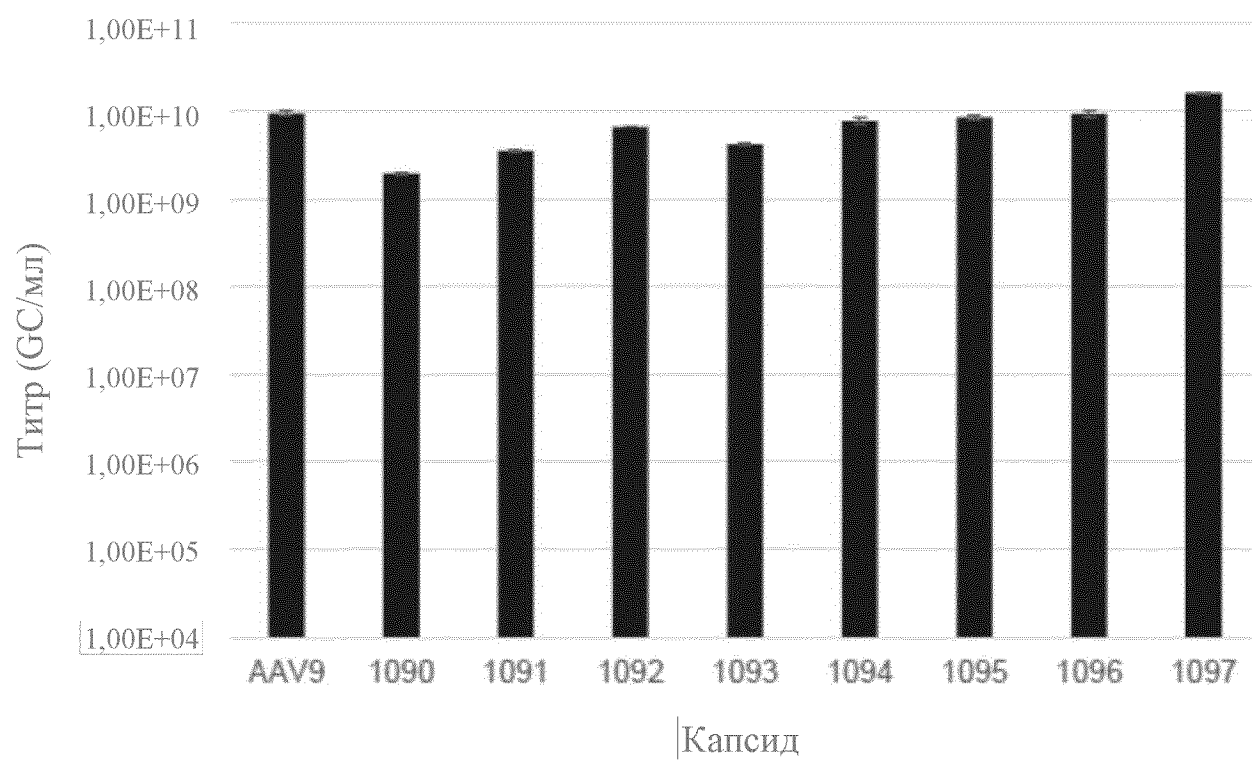
31. Упаковывающая клетка, способная экспрессировать нуклеиновую кислоту по п. 30 для получения векторов AAV, содержащих капсидный белок, кодируемый указанной нуклеотидной последовательностью.

	VR-IV
Консенсусный	YYLSRTQ-NTGGTAXXQTL LFSQXGPSNMSXQAKNW
1. AAV1 Капсид	YYLNRTQ-NQSGSAQNKDIL LFSRGSPAGMSVQPKNW
2. AAV2 Капсид	YYLSRTN-TPSGTTTQSRIL QFSQAGASD I RDQSRNW
3. AAV3 Капсид	YYLNRTQGTTS GTTNQSRIL LFSQAGPQSM SLQARNW
4. AAV4 Капсид	WG LQSTTTGTT L NAGTATTNFTKL RPTNFSNF KKNW
5. AAV5 Капсид	YRFVSTN-NTGG-----VQFNKNLAGRYANTYKNW
6. AAV6 Капсид	YYLNRTQ-NQSGSAQNKDIL LFSRGSPAGMSVQPKNW
7. AAV7 Капсид	YYLARTQSNPGGTAGNREL QFYQGGPSTMAEQAKNW
8. AAV8 Капсид	YYLSRTQ-TTGGTANTQTL GFSQGGPNTMANQAKNW
9. AAV9 Капсид	YYLSKT--INGSGQNQQTL KFSVAGPSNMAVQGRNY
10. AAVrh.10 Капсид	YYLSRTQ-STGGTAGTQQL LFSQAGPNNMSAQAKNW

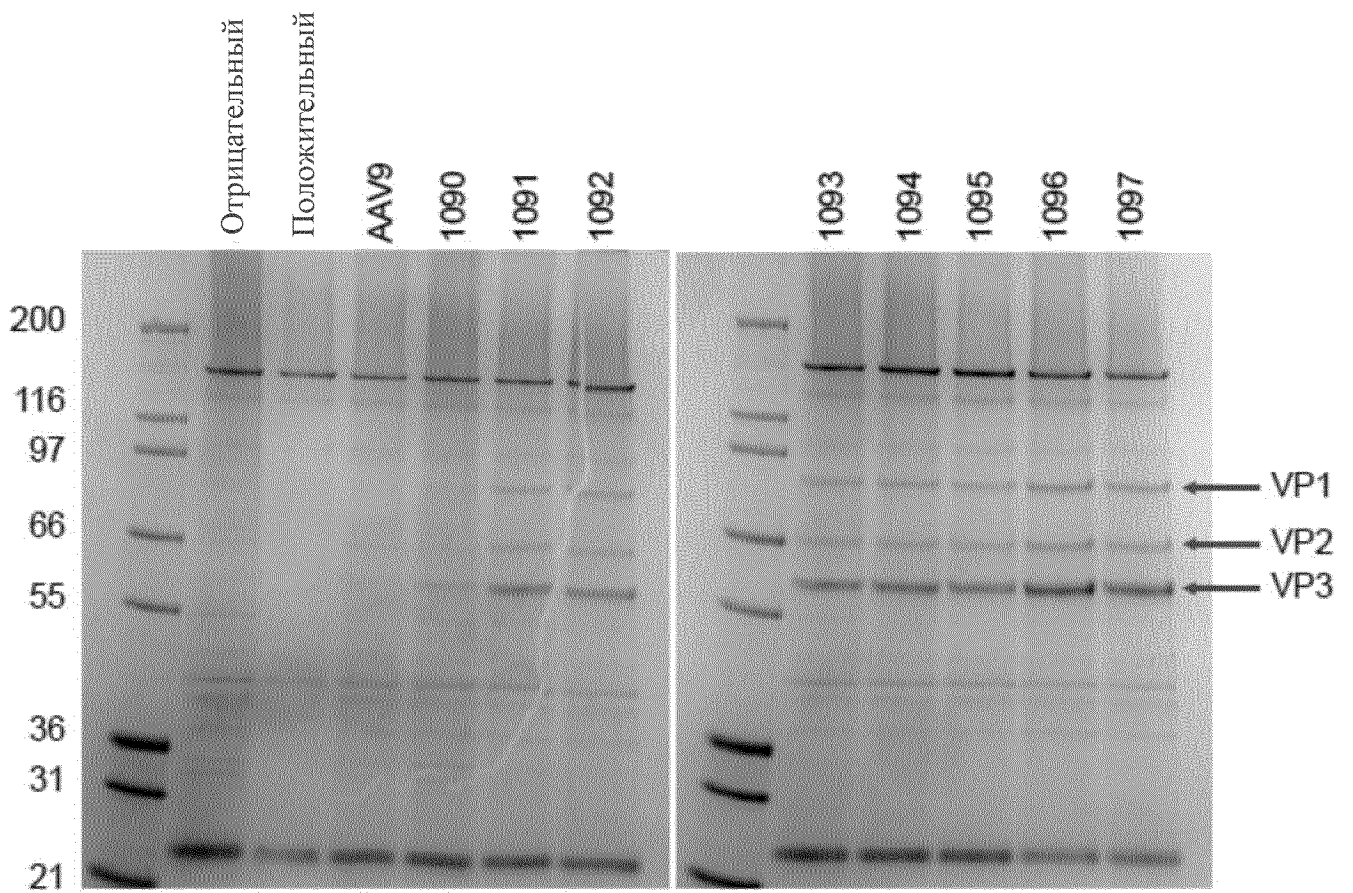
Фиг. 1



Фиг. 2

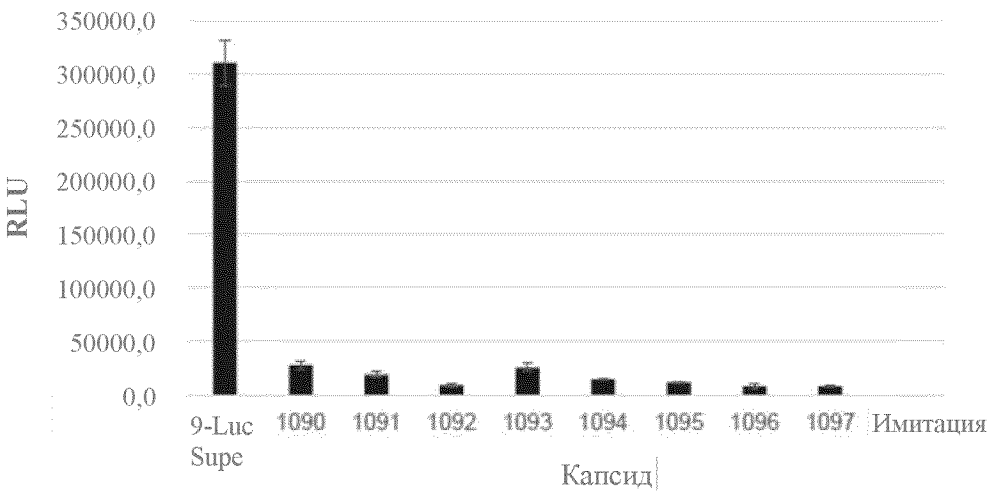


Фиг. 3



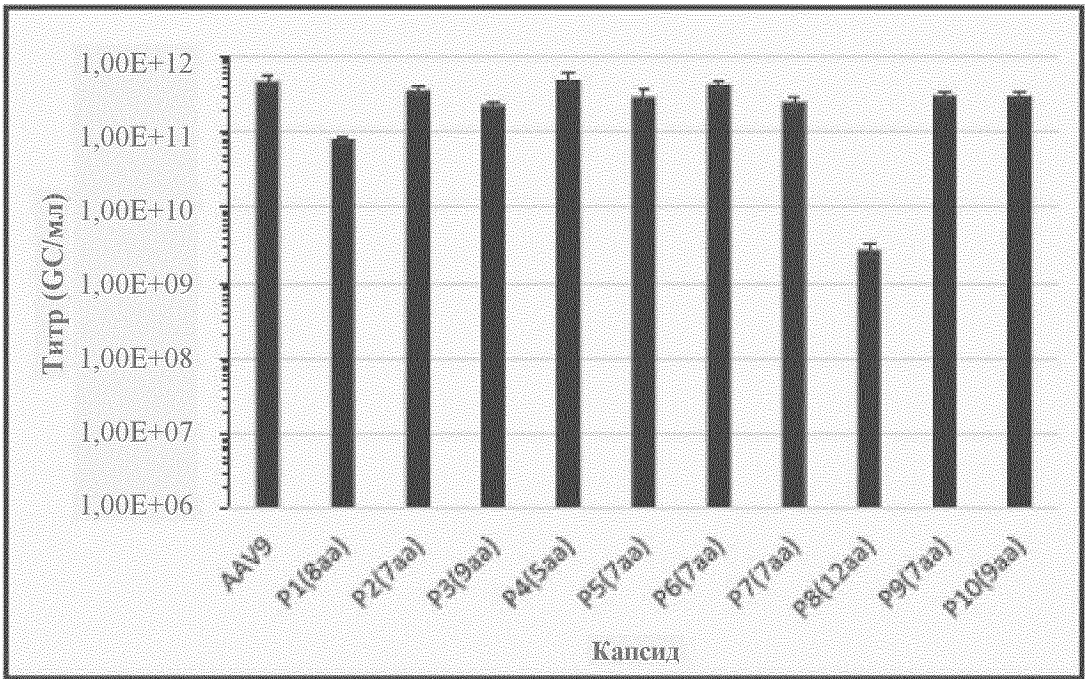
Фиг. 4

Капсид	% 9-лuc масс.
9-luc	100
1090	8,9
1091	6,1
1092	3,2
1093	8,2
1094	4,9
1095	4,0
1096	2,8
1097	2,8

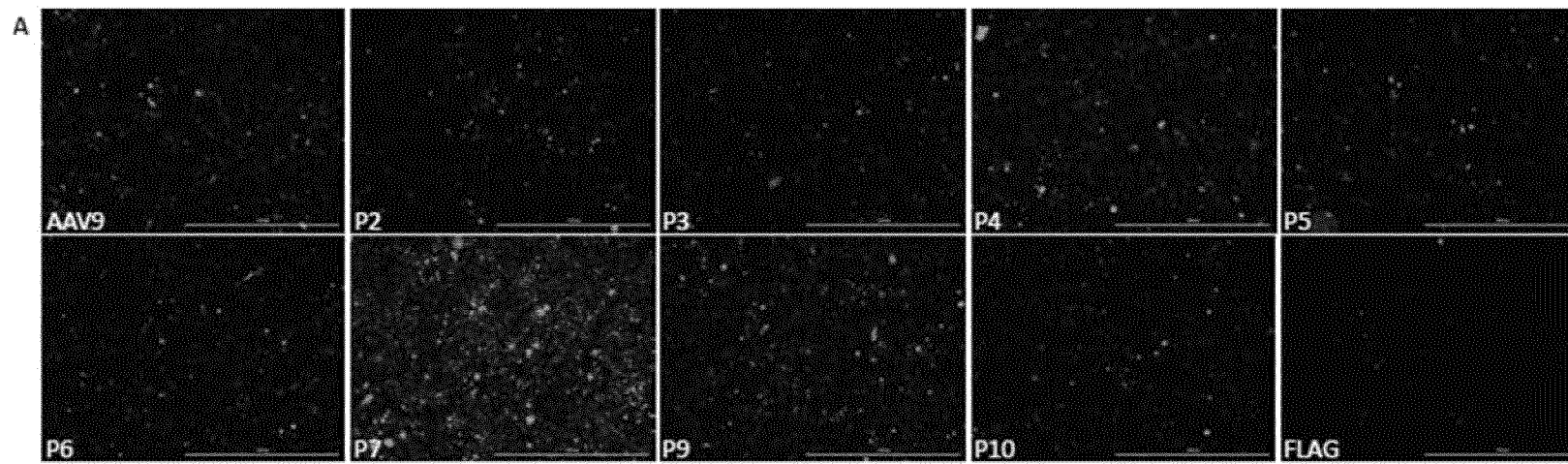


Фиг. 5А

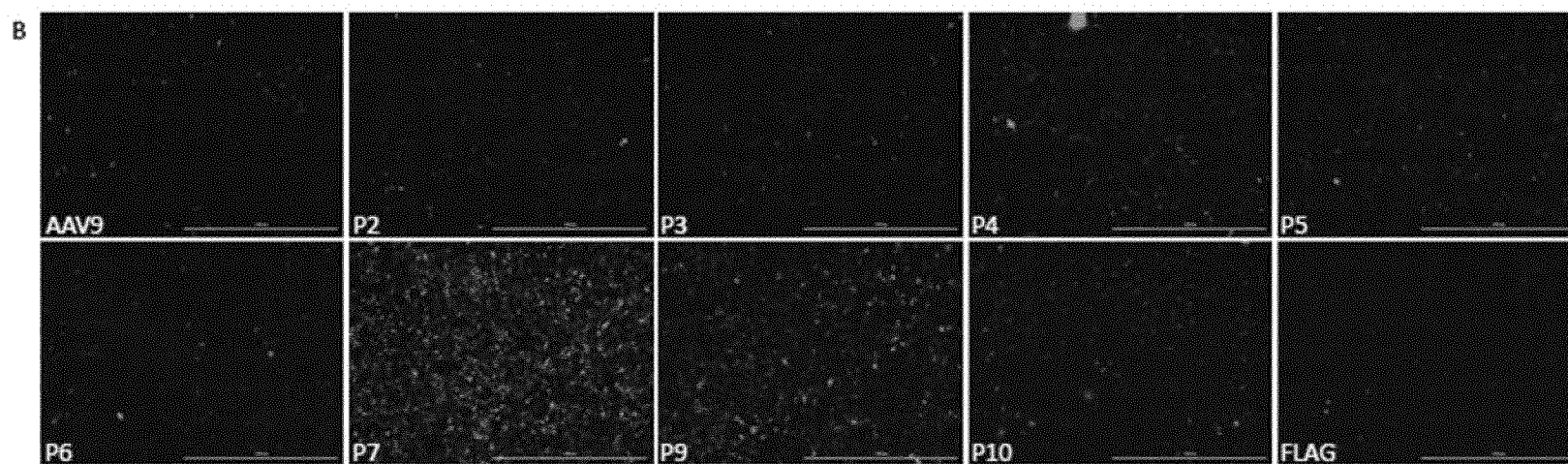
Фиг. 5В



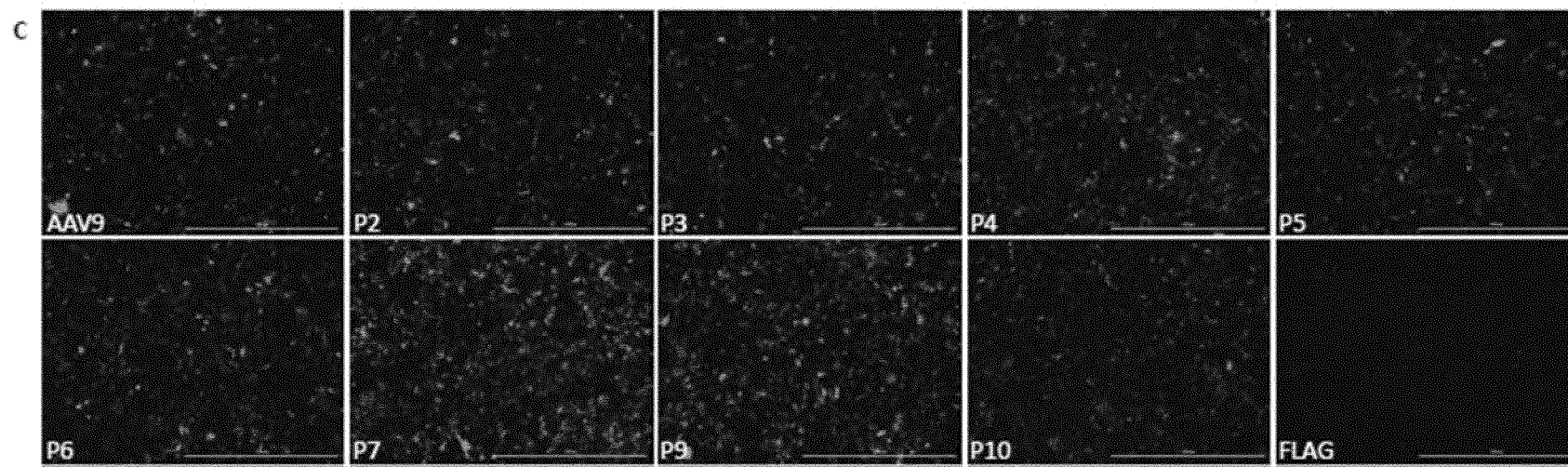
Фиг. 6А



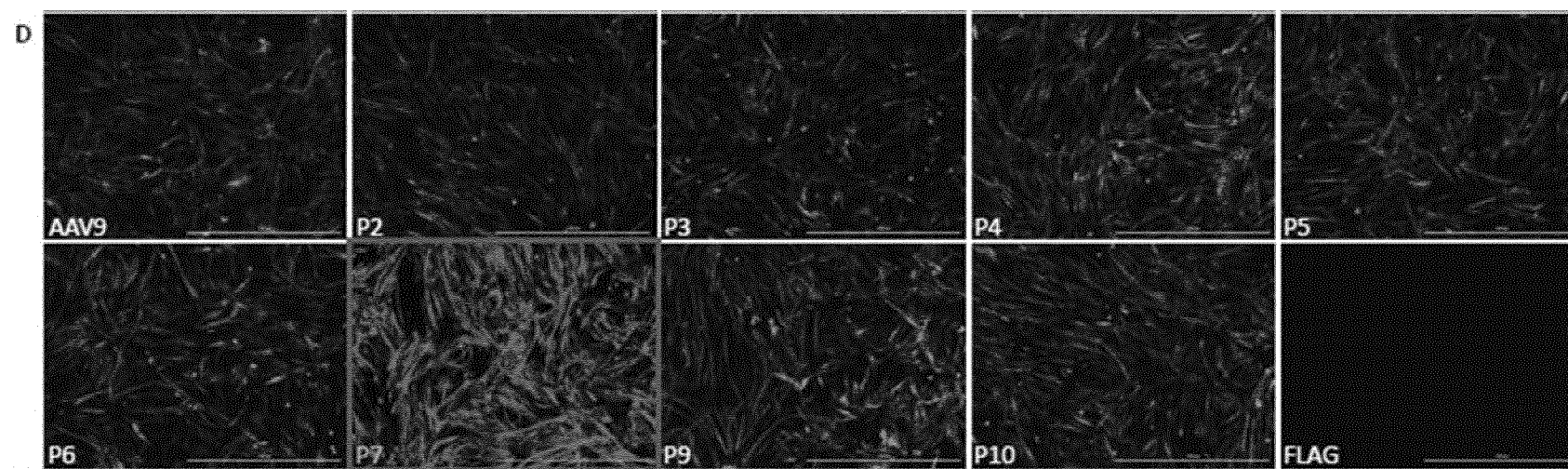
Фиг. 6B - LEC2 клеточная линия



Фиг. 6C - HT-22 клеточная линия



Фиг. 6D - hCMEC/D3 клеточная линия



Фиг. 6E - C2C12 клеточная линия

Фиг. 7 ВЫРАВНИВАНИЕ КАПСИДА AAVS 1-9, 3В, 9е, RH10, RH20, RH39, RH73, RH74, HU12, HU21, HU26, HU37, HU51 и HU53 С МЕСТАМИ ВСТАВКИ, ВЫДЕЛЕННЫМИ СЕРЫМ

AAV1	MAADGYLPDWLEDNLSEGI	REWWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLP	PGYKYLGP	FENGLD	60
AAV2	MAADGYLPDWLEDTLSEGI	RQWWKLKPGPPPKPAERHKDDSRGLVLP	PGYKYLGP	FENGLD	60
AAV3	MAADGYLPDWLEDNLSEGI	REWWALKPGVPQPKANQQHQDNRRGLVLP	PGYKYLGP	PGNGLD	60
AAV3-3	MAADGYLPDWLEDNLSEGI	REWWALKPGVPQPKANQQHQDNRRGLVLP	PGYKYLGP	PGNGLD	60
AAV3B	MAADGYLPDWLEDNLSEGI	REWWALKPGVPQPKANQQHQDNRRGLVLP	PGYKYLGP	PGNGLD	60
AAV4	-MTDGYLPDWLEDNLSEGI	REWWALQPGAPKPKANQQHQDNARGLVLP	PGYKYLGP	PGNGLD	59
AAV4-4	-MTDGYLPDWLEDNLSEGI	REWWALQPGAPKPKANQQHQDNARGLVLP	PGYKYLGP	PGNGLD	59
AAV5	MSFVDHFPDWLEE-VGEGL	REPLGLEAGPPKPKPNQQHQDQARGLVLP	PGYNYLGP	PGNGLD	59
AAV6	MAADGYLPDWLEDNLSEGI	REWWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLP	PGYKYLGP	FENGLD	60
AAV7	MAADGYLPDWLEDNLSEGI	REWWDLKPGAPKPKANQQKQDNGRGLVLP	PGYKYLGP	FENGLD	60
AAV8	MAADGYLPDWLEDNLSEGI	REWWALKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLP	PGYKYLGP	FENGLD	60
AAV9	MAADGYLPDWLEDNLSEGI	REWWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLP	PGYKYLGP	PGNGLD	60
AAV9e	MAADGYLPDWLEDNLSEGI	REWWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLP	PGYKYLGP	PGNGLD	60
rh.10	MAADGYLPDWLEDNLSEGI	REWWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLP	PGYKYLGP	FENGLD	60
rh.20	MAADGYLPDWLEDNLSEGI	REWWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLP	PGYKYLGP	FENGLD	60
rh.39	MAADGYLPDWLEDNLSEGI	REWWALKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLP	PGYKYLGP	FENGLD	60
rh.73	MAADGYLPDWLEDNLSEGI	REWWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLP	PGYKYLGP	FENGLD	60
rh.74v1	MAADGYLPDWLEDNLSEGI	REWWDLKPGAPKPKANQQKQDNGRGLVLP	PGYKYLGP	FENGLD	60
rh.74v2	MAADGYLPDWLEDNLSEGI	REWWDLKPGAPKPKANQQKQDNGRGLVLP	PGYKYLGP	FENGLD	60
hu.12	MAADGYLPDWLEDTLSEGI	RQWWKLKPGPPPKPAERHQDDSRGLVLP	PGYKYLGP	FENGLD	60
hu.21	MAADGYLPDWLEDTLSEGI	RQWWKLKPGPPPKPAERHKDDSRGLVLP	PGYKYLGP	FENGLD	60
hu.26	MAADGYLPDWLEDTLSEGI	RQWWKLKPGPPPKPAERHKDDSRGLVLP	PGYKYLGP	FENGLD	60
hu.37	MAADGYLPDWLEDNLSEGI	REWWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLP	PGYKYLGP	FENGLD	60
hu.51	MAADGYLPDWLEDTLSEGI	RQWWKLKPGPPPKPAERHKDDSRGLVLP	PGYKYLGP	FENGLD	60
hu.53	MAADGYLPDWLEDTLSEGI	RQWWKLKPGPPPKPAERHKDDSRGLVLP	PGYKYLGP	FENGLD	60
.: *****: :.***: : : * * * * : : : : : *****: ***** *					

AAV1	KGEFVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQ	120
AAV2	KGEFVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQ	120
AAV3	KGEFVNEADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQ	120
AAV3-3	KGEFVNEADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQ	120
AAV3B	KGEFVNEADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQ	120
AAV4	KGEFVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQ	119
AAV4-4	KGEFVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQ	119
AAV5	RGEFVNRADEVAREHDISYNEQLEAGDNPYLKYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQ	119
AAV6	KGEFVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQ	120
AAV7	KGEFVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQ	120
AAV8	KGEFVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQ	120
AAV9	KGEFVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQ	120
AAV9e	KGEFVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQ	120
rh.10	KGEFVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQ	120
rh.20	KGEFVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQ	120
rh.39	KGEFVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQ	120
rh.73	KGEFVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQ	120
rh.74v1	KGEFVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQ	120
rh.74v2	KGEFVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQ	120
hu.12	KGEFVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQ	120
hu.21	KGEFVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQ	120
hu.26	KGEFVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQ	120
hu.37	KGEFVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQ	120
hu.51	KGEFVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQ	120
hu.53	KGEFVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQ	120

AAV1	AKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEQSPQ-EPDSSSGIGKTGQQPAKKRLNFGQTGDS	179
AAV2	AKKRVLEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPV-EPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDA	179
AAV3	AKKRILEPLGLVEEAAKTAPGKKGAVDQSPQ-EPDSSSGVGKSGKQPARKRLNFGQTGDS	179
AAV3-3	AKKRILEPLGLVEEAAKTAPGKKGAVDQSPQ-EPDSSSGVGKSGKQPARKRLNFGQTGDS	179
AAV3B	AKKRILEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVDQSPQ-EPDSSSGVGKSGKQPARKRLNFGQTGDS	179
AAV4	AKKRVLEPLGLVEQAGETAPGKKRPLIESPQ-QPDSSTGIGKKGKQPAKKKLVFEDETGA	178
AAV4-4	AKKRVLEPLGLVEQAGETAPGKKRPLIESPQ-QPDSSTGIGKKGKQPAKKKLVFEDETGA	178
AAV5	AKKRVLEPFGLVEEGAKTAPTGRIDDHFPKRKKARTEEDSKP-----STSSDA	168
AAV6	AKKRVLEPFGLVEEGAKTAPGKKRPVEQSPQ-EPDSSSGIGKTGQQPAKKRLNFGQTGDS	179
AAV7	AKKRVLEPLGLVEEGAKTAPAKKRPFVEPSPQRSPTSSTGIGKKGQQPARKRLNFGQTGDS	180
AAV8	AKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEPSPQRSPTSSTGIGKKGQQPARKRLNFGQTGDS	180
AAV9	AKKRILEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEQSPQ-EPDSSAGIGKSGAQPAKKRLNFGQTGDT	179
AAV9e	AKKRILEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEQSPQ-EPDSSAGIGKSGAQPAKKRLNFGQTGDT	179
rh.10	AKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEPSPQRSPTSSTGIGKKGQQPARKRLNFGQTGDS	180
rh.20	AKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEPSPQRSPTSSTGIGKTGQQPARKRLNFGQTGDS	180
rh.39	AKKRVLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEPSPQRSPTSSTGIGKKGQQPARKRLNFGQTGDS	180
rh.73	AKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEPSPQRSPTSSTGIGKKGQQPARKRLNFGQTGDS	180
rh.74v1	AKKRVLEPLGLVESPVKTAPGKKRPVEPSPQRSPTSSTGIGKKGQQPARKRLNFGQTGDS	180
rh.74v2	AKKRVLEPLGLVESPVKTAPGKKRPVEPSPQRSPTSSTGIGKKGQQPARKRLNFGQTGDS	180
hu.12	AKKRVLEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPV-EPDSSSGTGKAGHQPARKRLNFGQTGDA	179
hu.21	AKKRILEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPA-EPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDA	179
hu.26	AKKRILEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPA-EPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDA	179
hu.37	AKKRVLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEPSPQRSPTSSTGIGKKGQQPARKRLNFGQTGDS	180
hu.51	AKKRVLEPLGLVGEVPVKTAPGKKRPVEHSPV-EPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDA	179
hu.53	AKKRVLEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPA-EPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDA	179

****:***:****. :*** * * . : .*

AAV1	ESVP-DPQPLGEPPATFAAVGPTTMASSGGGAPMADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGD	238
AAV2	DSVP-DPQPLGEPPAAPSGLTNTMATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGD	238
AAV3	ESVP-DPQPLGEPPAAPTSLGSNTMASGGGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSQWLGD	238
AAV3-3	ESVP-DPQPLGEPPAAPTSLGSNTMASGGGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSQWLGD	238
AAV3B	ESVP-DPQPLGEPPAAPTSLGSNTMASGGGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSQWLGD	238
AAV4	GDGP----PEGSTSGAMS--DDSEMRAAAGGAAVEGGQADGVGNASGDWHCDSTWSEGH	232
AAV4-4	GDGP----PEGSTSGAMS--DDSEMRAAAGGAAVEGGQADGVGNASGDWHCDSTWSEGH	232
AAV5	EAGFSGSQQLQIPAPASSLGADTMSAGGGGFLGDNNQADGVGNASGDWHCDSTWMGD	228
AAV6	ESVP-DPQPLGEPPATFAAVGPTTMASSGGGAPMADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGD	238
AAV7	ESVP-DPQPLGEPPAAPSSVSGSTVAAGGGAPMADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGD	239
AAV8	ESVP-DPQPLGEPPAAPSGVGPNTMAAGGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGD	239
AAV9	ESVP-DPQPIGEPPAAPSGVSLTMAAGGGAPVADNNEGADGVGSSSGNWHCDSQWLGD	238
AAV9e	ESVP-DPQPIGEPPAAPSGVSLTMAAGGGAPVADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGD	238
rh.10	ESVP-DPQPIGEPPAGPSGLSGTMAAGGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGD	239
rh.20	ESVP-DPQPIGEPPAGPSGLSGTMAAGGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGD	239
rh.39	ESVP-DPQPIGEPPAGPSGLSGTMAAGGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGD	239
rh.73	ESVP-DPQPLGEPPAAPSSVSGSTMAAGGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGD	239
rh.74v1	ESVP-DPQPIGEPPAGPSGLSGTMAAGGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGD	239
rh.74v2	ESVP-DPQPIGEPPAGPSGLSGTMAAGGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGD	239
hu.12	DSVP-DPQPLGEPPAAPTSLGSTTMTATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSQWLGD	238
hu.21	DSVP-DPRPLGQPPAAPSGLTNTMASGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGD	238
hu.26	DSVP-DPQPLGEPPAAPSGLTNTMASGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGD	238
hu.37	ESVP-DPQPIGEPPAGPSGLSGTMAAGGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGD	239
hu.51	DSVP-DPQPLGQPPAAPSGLTNTMATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGD	238
hu.53	DSVP-DPQPLRQPPAAPTSLGSTTMTATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSQWLGD	238

* : . : ...* . :...*****:***:***** * ..

AAV1	VITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSAST-GASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFS	297
AAV2	VITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQ-S-GASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFS	296
AAV3	VITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQ-S-GASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFS	296
AAV3-3	VITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQ-S-GASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFS	296
AAV3B	VITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQ-S-GASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFS	296
AAV4	VTTTSTRTWVLPPTYNNHLYKRLGE-----SLQSNITYNGFSTPWGYFDFNRFHCHFS	287
AAV4-4	VTTTSTRTWVLPPTYNNHLYKRLGE-----SLQSNITYNGFSTPWGYFDFNRFHCHFS	287
AAV5	VVTKSTRTWVLPSTYNNHLYKQISSQ-S-GASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFS	287
AAV6	VITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSAST-GASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFS	297
AAV7	VITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSSETA-GSTNDNTYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFS	298
AAV8	VITTSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGATNDNTYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFS	299
AAV9	VITTSTRTWALPTYNNHLYKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFS	298
AAV9e	VITTSTRTWALPTYNNHLYKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFS	298
rh.10	VITTSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGSTNDNTYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFS	299
rh.20	VITTSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGSTNDNTYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFS	299
rh.39	VITTSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGSTNDNTYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFS	299
rh.73	VITTSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGSTNDNTYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFS	299
rh.74v1	VITTSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGSTNDNTYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFS	299
rh.74v2	VITTSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGSTNDNTYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFS	299
hu.12	VITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQS--GASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFS	296
hu.21	VITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQS--GASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFS	296
hu.26	VITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQS--GASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFS	296
hu.37	VITTSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGSTNDNTYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFS	299
hu.51	VITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQS--GASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFS	296
hu.53	VITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQS--GASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFS	296

* *.*****.***:***** *... : * * *.*****.***:*****

AAV1	AHQCCLPPFPADVFMI	PQYGYLTLNNG---	SQAVGRSSFYCLEYF	FP SQMLRTGNNFT	FSY	414	
AAV2	AHQCCLPPFPADVFMI	PQYGYLTLNNG---	SQAVGRSSFYCLEYF	FP SQMLRTGNNFT	FSY	413	
AAV3	AHQCCLPPFPADVFMI	PQYGYLTLNNG---	SQAVGRSSFYCLEYF	FP SQMLRTGNNF	QFSY	413	
AAV3-3	AHQCCLPPFPADVFMI	PQYGYLTLNNG---	SQAVGRSSFYCLEYF	FP SQMLRTGNNF	QFSY	413	
AAV3B	AHQCCLPPFPADVFMI	PQYGYLTLNNG---	SQAVGRSSFYCLEYF	FP SQMLRTGNNF	QFSY	413	
AAV4	GQEGSLPPFPNDVFMI	PQYGYLTLNNG---	SQAVGRSSFYCLEYF	FP SQMLRTGNNF	ITY	407	
AAV4-4	GQEGSLPPFPNDVFMI	PQYGYLTLNNG---	SQAVGRSSFYCLEYF	FP SQMLRTGNNF	ITY	407	
AAV5	GTEGCLPAPPPQVFTLP	PQYGYATLNRDNT-	ENPT	RTSSFFCLEYF	FP SKMLRTGNNF	EITY	406
AAV6	AHQCCLPPFPADVFMI	PQYGYLTLNNG---	SQAVGRSSFYCLEYF	FP SQMLRTGNNFT	FSY	414	
AAV7	AHQCCLPPFPADVFMI	PQYGYLTLNNG---	SQAVGRSSFYCLEYF	FP SQMLRTGNNF	FSY	415	
AAV8	AHQCCLPPFPADVFMI	PQYGYLTLNNG---	SQAVGRSSFYCLEYF	FP SQMLRTGNNF	QITY	416	
AAV9	AHEGCLPPFPADVFMI	PQYGYLTLNDG---	SQAVGRSSFYCLEYF	FP SQMLRTGNNF	QFSY	415	
AAV9e	AHEGCLPPFPADVFMI	PQYGYLTLNDG---	SQAVGRSSFYCLEYF	FP SQMLRTGNNF	QFSY	415	
rh.10	AHQCCLPPFPADVFMI	PQYGYLTLNNG---	SQAVGRSSFYCLEYF	FP SQMLRTGNNF	FSY	416	
rh.20	AHQCCLPPFPADVFMI	PQYGYLTLNNG---	SQAVGRSSFYCLEYF	FP SQMLRTGNNF	FSY	416	
rh.39	AHQCCLPPFPADVFMI	PQYGYLTLNNG---	SQAVGRSSFYCLEYF	FP SQMLRTGNNF	FSY	416	
rh.73	AHQCCLPPFPADVFMI	PQYGYLTLNNG---	SQAVGRSSFYCLEYF	FP SQMLRTGNNF	FSY	416	
rh.74v1	AHQCCLPPFPADVFMI	PQYGYLTLNNG---	SQAVGRSSFYCLEYF	FP SQMLRTGNNF	FSY	416	
rh.74v2	AHQCCLPPFPADVFMI	PQYGYLTLNNG---	SQAVGRSSFYCLEYF	FP SQMLRTGNNF	FSY	416	
hu.12	AHQCCLPPFPADVFMI	PQYGYLTLNNG---	SQAVGRSSFYCLEYF	FP SQMLRTGNNF	FSY	413	
hu.21	AHQCCLPPFPADVFMI	PQYGYLTLNNG---	SQAVGRSSFYCLEYF	FP SQMLRTGNNF	FSY	413	
hu.26	AHQCCLPPFPADVFMI	PQYGYLTLNNG---	SQAVGRSSFYCLEYF	FP SQMLRTGNNF	FSY	413	
hu.37	AHQCCLPPFPADVFMI	PQYGYLTLNNG---	SQAVGRSSFYCLEYF	FP SQMLRTGNNF	FSY	416	
hu.51	AHQCCLPPFPADVFMI	PQYGYLTLNNG---	SQAVGRSSFYCLEYF	FP SQMLRTGNNF	FSY	413	
hu.53	AHQCCLPPFPADVFMI	PQYGYLTLNNG---	SQAVGRSSFYCLEYF	FP SQMLRTGNNF	QFSY	413	

AAV1	TFEEVPPHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLNRTQ	QSGSAQNKDLLFSRGSPAGMSV	473
AAV2	TFEDVPPHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSRTN	TPSGTTTQSRLOFSQAGASDIRD	472
AAV3	TFEDVPPHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLNRTQ	GTTS GTTNQSRLLFSQAGPQMSL	473
AAV3-3	TFEDVPPHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLNRTQ	GTTS GTTNQSRLLFSQAGPQMSL	473
AAV3B	TFEDVPPHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLNRTQ	GTTS GTTNQSRLLFSQAGPQMSL	473
AAV4	SFEKVPPHSMYAHSQSLDRLMNPLIDQYLWGLQST	TGTTLNAGTATTNFTKLRPTNFSN	467
AAV4-4	SFEKVPPHSMYAHSQSLDRLMNPLIDQYLWGLQST	TGTTLNAGTATTNFTKLRPTNFSN	467
AAV5	NFEEVPPHSSFAPSQNLFLKLANPLVDQYLYRFVST	NNTG-----GVQFNKNLAGRYAN	459
AAV6	TFEDVPPHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLNRTQ	QSGSAQNKDLLFSRGSPAGMSV	473
AAV7	SFEDVPPHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSRTQ	SNPGGTAGNRELQFYQGGPSTMAE	475
AAV8	TFEDVPPHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSRTQ	TGTTANTQTLGFSQGGPNTMAN	475
AAV9	EFENVPPHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSKT	INGS--GQNQQTLLKFSVAGPSNMAV	473
AAV9e	EFENVPPHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSKT	INGS--GQNQQTLLKFSVAGPSNMAV	473
rh.10	QFEDVPPHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSRTQ	TGTTAGTQQLLFSQAGPNNMSA	475
rh.20	QFEDVPPHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSRTQ	TGTTAGTQQLLFSQAGPNNMSA	475
rh.39	TFEDVPPHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSRTQ	TGTTAGTQQLLFSQAGPNNMSA	475
rh73	TFEDVPPHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSRTQ	TGTTAGTQQLLFSQAGPNNMSA	475
rh.74v1	NFEDVPPHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSRTQ	TGTTAGTQQLLFSQAGPNNMSA	475
rh.74v2	NFEDVPPHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSRTQ	TGTTAGTQQLLFSQAGPNNMSA	475
hu.12	TFEDVPPHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLNRTQ	NSGTLOQSRLLFSQAGPTSMSL	472
hu.21	TFEDVPPHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSRTN	TPSGTTTMSRLQFSQAGASDIRD	472
hu.26	TFEDVPPHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSRTN	TPSGTTTMSRLQFSQAGASDIRD	472
hu.37	TFEDVPPHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSRTQ	TGTTAGTQQLLFSQAGPNNMSA	475
hu.51	TFEDVPPHSGYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSRTN	TPSGTTTQSRLOFSQAGASDIRD	472
hu.53	TFEDVPPHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLNRTQ	TASGTQ-QSRLLFSQAGPTSMSL	471

*.***** : * *. * : * *.*****: : * *

AAV1	QPKNWLPGPCYRQQRVSKTKTDNNNSNF-----	TWTGASKYNLNGRESIINPGTAMASHK	528
AAV2	QSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSNF-----	SWTGATKYHLNGRDSLVPNPGPAMASHK	527
AAV3	QARNWLPGPCYRQQRLSKTANDNNNSNF-----	PWTAASKYHLNGRDSLVPNPGPAMASHK	528
AAV3-3	QARNWLPGPCYRQQRLSKTANDNNNSNF-----	PWTAASKYHLNGRDSLVPNPGPAMASHK	528
AAV3B	QARNWLPGPCYRQQRLSKTANDNNNSNF-----	PWTAASKYHLNGRDSLVPNPGPAMASHK	528
AAV4	FKKNWLPGPSIKQGGFSKTANQNYKIPATGSDSLIKYETHSTLDGRWSALT	PGPPMATAG	527
AAV4-4	FKKNWLPGPSIKQGGFSKTANQNYKIPATGSDSLIKYETHSTLDGRWSALT	PGPPMATAG	527
AAV5	TYKNWPPGPMGRTOGWNLGSGVNRASVS-----	AFATTNRMELEGASYQVPPQPNGMTNN	514
AAV6	QPKNWLPGPCYRQQRVSKTKTDNNNSNF-----	TWTGASKYNLNGRESIINPGTAMASHK	528
AAV7	QAKNWLPGPCFRQQRVSKTLDQNNNSNF-----	AWTGATKYHLNGRDSLVPNPGVAMATHK	530
AAV8	QAKNWLPGPCYRQQRVSTTTGQNNNSNF-----	AWTGATKYHLNGRDSLVPNPGVAMATHK	530
AAV9	QGRNYIPGPSYRQQRVSTTTVTQNNNSNF-----	AWPGASSWALNGRDSLVPNPGPAMASHK	528
AAV9e	QGRNYIPGPSYRQQRVSTTTVTQNNNSNF-----	AWPGASSWALNGRDSLVPNPGPAMASHK	528
rh.10	QAKNWLPGPCYRQQRVSTTTLSQNNNSNF-----	AWTGATKYHLNGRDSLVPNPGVAMATHK	530
rh.20	QAKNWLPGPCYRQQRVSTTTLSQNNNSNF-----	AWTGATKYHLNGRDSLVPNPGVAMATHK	530
rh.39	QAKNWLPGPCYRQQRVSTTTLSQNNNSNF-----	AWTGATKYHLNGRDSLVPNPGVAMATHK	530
rh.73	QARNWLPGPCYRQQRVSTTTLSQNNNSNF-----	AWTGATKYHLNGRDSLVPNPGVAMATNK	530
rh.74v1	QAKNWLPGPCYRQQRVSTTTLSQNNNSNF-----	AWTGATKYHLNGRDSLVPNPGVAMATHK	530
rh.74v2	QAKNWLPGPCYRQQRVSTTTLSQNNNSNF-----	AWTGATKYHLNGRDSLVPNPGVAMATHK	530
hu.12	QAKNWLPGPCYRQQRLSKQANDNNNSNF-----	PWTAATKYHLNGRDSLVPNPGPAMASHK	527
hu.21	QSRNWLPGPCYRQQRVSKTAADNNNSDY-----	SWTGATKYHLNGRDSLVPNPGPAMASHK	527
hu.26	QSRNWLPGPCYRQQRVSKTAADNNNSDY-----	SWTGATKYHLNGRDSLVPNPGPAMASHK	527
hu.37	QAKNWLPGPCYRQQRVSTTTLSQNNNSNF-----	AWTGATKYHLNGRDSLVPNPGVAMATHK	530
hu.51	QSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSNF-----	SWTGATKYHLNGRDSLVPNPGPAMASHK	527
hu.53	QAKNWLPGPCYRQQRLSKQANDNNNSNF-----	PWTGATKYHLNGRDSLVPNPGPAMASHK	526

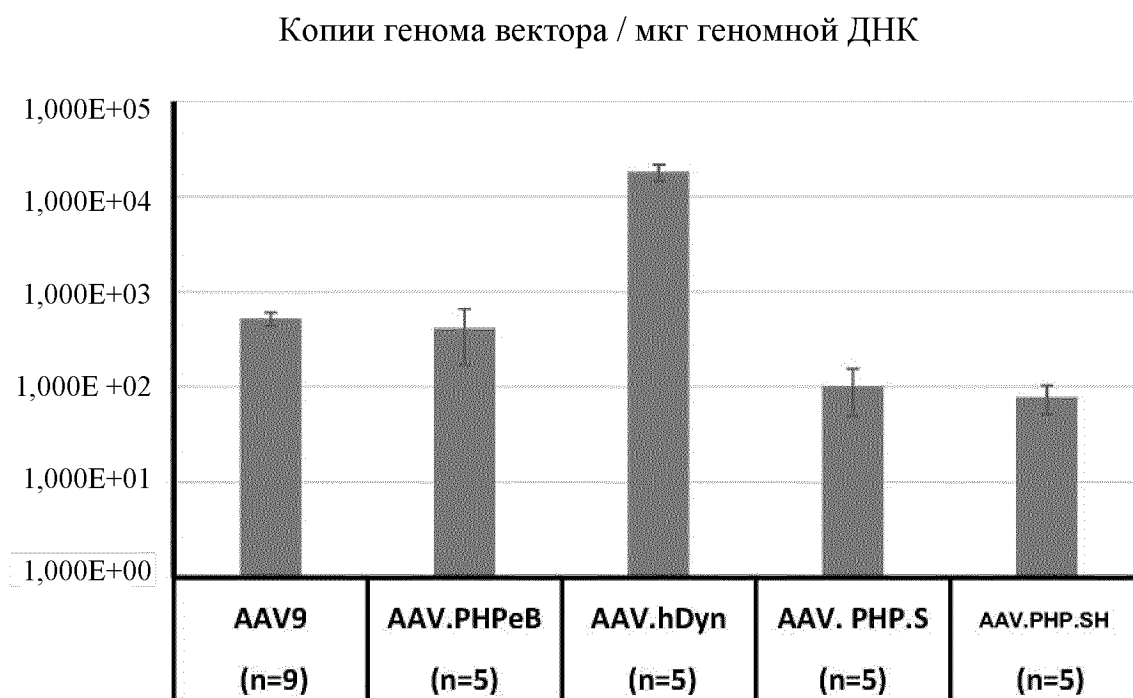
:*:*** : * . * . * : * :

AAV1	DDEDKFFPMSGVMI FGKESAGA---SNTALDNVMITDEEEIKATNPVATERFGTVAVNFQ	585
AAV2	DDEEKFFPQSGVLI FGKQGSEK---TNVDIEKVMITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNLQ	584
AAV3	DDEEKFFPMHGNLI FGKEGTTA---SNAELDNVMITDEEEIRTTNPVATEQYGTVANNLQ	585
AAV3-3	DDEEKFFPMHGNLI FGKEGTTA---SNAELDNVMITDEEEIRTTNPVATEQYGTVANNLQ	585
AAV3B	DDEEKFFPMHGNLI FGKEGTTA---SNAELDNVMITDEEEIRTTNPVATEQYGTVANNLQ	585
AAV4	PADSKFSN-SQLIFAGPKQNGN---TATVPGTLIFTSEEELAAATNATD TDMWGNLPGGDQ	583
AAV4-4	PADSKFSN-SQLIFAGPKQNGN---TATVPGTLIFTSEEELAAATNATD TDMWGNLPGGDQ	583
AAV5	LQGSNTYALENTMI FNSQPANPGTTATYLEGNMLITSESETQPVNRVAYNVGGQMATNNQ	574
AAV6	DDKD KFFPMSGVMI FGKESAGA---SNTALDNVMITDEEEIKATNPVATERFGTVAVNLQ	585
AAV7	DDED RFFPSSGVLIFGKTGATN---KTTLENVLMTNEEEIRPTNPVATEEYGVSSNLQ	586
AAV8	DDEERFFPSSNGILIFGKQNAAR---DNADYSSVMLTSEEEIKTTNPVATEEYGVADNLQ	587
AAV9	EGED RFFPLSGSLIFGKQGTGR---DNVDADKVMITNEEEIKTTNPVATESYGVQVATNHQ	585
AAV9e	EGED RFFPLSGSLIFGKQGTGR---DNVDADKVMITNEEEIKTTNPVATESYGVQVATNHQ	585
rh.10	DDEERFFPSSGVLMPGKQGAGK---DNVDYSSVMLTSEEEIKTTNPVATEQYGVVADNLQ	587
rh.20	DDEERFFPSSGVLMPGKQGAGK---DNVDYSSVMLTSEEEIKTTNPVATEQYGVVADNLQ	587
rh.39	DDEERFFPSSGVLMPGKQGAGR---DNVDYSSVMLTSEEEIKTTNPVATEQYGVVADNLQ	587
rh.73	DDEERFFPSSGILMPGKQGAGK---DNVDYSSVMLTSEEEIKTTNPVATEQYGVVADNLQ	587
rh.74v1	DDEERFFPSSGVLMPGKQGAGK---DNVDYSSVMLTSEEEIKTTNPVATEQYGVVADNLQ	587
rh.74v2	DDEERFFPSSGVLMPGKQGAGK---DNVDYSSVMLTSEEEIKTTNPVATEQYGVVADNLQ	587
hu.12	DDEEKFFPMHGTLIFGKQGTNA---NDADLEHVMITDEEEIRTTNPVATEQYGNVSNNLQ	584
hu.21	DDEEKYFPQSGVLI FGKQDSGK---TNVDIEKVMITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNLQ	584
hu.26	DDEEKYFPQSGVLI FGKQDSGK---TNVDIEKVMITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNLQ	584
hu.37	DDEERFFPSSGVLMPGKQGAGR---DNVDYSSVMLTSEEEIKTTNPVATEQYGVVADNLQ	587
hu.51	DNEEKFFPQSGVLI FGKQGSEK---TNVDIEKVMITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNLQ	584
hu.53	DDEEKFFPMHGTLIFGKEGTNA---TNAELNVMITDEEEIRTTNPVATEQYGYVSNNLQ	583

AAV1	SSN#TDPATGDVHAMGALPGMVWQDRDVYLQGGPIWAKI PHTDGHFHSPSLMGGFGLKN-PPP	641
AAV2	RGN#RQAATADVNTQGVLPGMVWQDRDVYLQGGPIWAKI PHTDGHFHSPSLMGGFGLKH-PPP	644
AAV3	SSN#TAPTTGTVNHQGALPGMVWQDRDVYLQGGPIWAKI PHTDGHFHSPSLMGGFGLKH-PPP	645
AAV3-3	SSN#TAPTTGTVNHQGALPGMVWQDRDVYLQGGPIWAKI PHTDGHFHSPSLMGGFGLKH-PPP	645
AAV3B	SSN#TAPTTTRVNDQGALPGMVWQDRDVYLQGGPIWAKI PHTDGHFHSPSLMGGFGLKH-PPP	645
AAV4	SNS#NLPTVDRLTALGAVPGMVWQNRDIYYQGGPIWAKI PHTDGHFHSPSLIGGFGLKH-PPP	643
AAV4-4	SNS#NLPTVDRLTALGAVPGMVWQNRDIYYQGGPIWAKI PHTDGHFHSPSLIGGFGLKH-PPP	643
AAV5	SST#TAPATGTYNLQEI VPGSVWMERDVYLQGGPIWAKI PETGAHFHSPAMGGFGLKH-PPP	634
AAV6	SSS#TDPATGDVHVMGALPGMVWQDRDVYLQGGPIWAKI PHTDGHFHSPSLMGGFGLKH-PPP	645
AAV7	AAN#TAAQTQVNVNNQGALPGMVWQNRDVYLQGGPIWAKI PHTDGNFHSPSLMGGFGLKH-PPP	646
AAV8	QQN#TAPQIGTVNSQGALPGMVWQNRDVYLQGGPIWAKI PHTDGNFHSPSLMGGFGLKH-PPP	647
AAV9	SAQ#AQAOQTGWVQNQGLLPGMVWQDRDVYLQGGPIWAKI PHTDGNFHSPSLMGGFGMKH-PPP	645
AAV9e	SDG#AQAOQTGWVQNQGLLPGMVWQDRDVYLQGGPIWAKI PHTDGNFHSPSLMGGFGMKH-PPP	645
AAVrh10	QQN#AAPIVGAVNSQGALPGMVWQNRDVYLQGGPIWAKI PHTDGNFHSPSLMGGFGLKH-PPP	647
AAVrh20	QQN#AAPIVGAVNSQGALPGMVWQNRDVYLQGGPIWAKI PHTDGNFHSPSLMGGFGLKH-PPP	647
rh.39	QTN#TGPIVGNVNSQGALPGMVWQNRDVYLQGGPIWAKI PHTDGNFHSPSLMGGFGLKH-PPP	647
rh.73	RQN#TAPIVGAVNSQGALPGMVWQNRDVYLQGGPIWAKI PHTDGNFHSPSLMGGFGLKH-PPP	647
rh.74v1	QQN#AAPIVGAVNSQGALPGMVWQNRDVYLQGGPIWAKI PHTDGNFHSPSLMGGFGLKH-PPP	647
rh.74v2	QQN#AAPIVGAVNSQGALPGMVWQNRDVYLQGGPIWAKI PHTDGNFHSPSLMGGFGLKH-PPP	647
hu.12	NSN#TGPTTENVNHQGALPGMVWQDRDVYLQGGPIWAKI PHTDGHFHSPSLMGGFGLKH-PPP	644
hu.21	SGN#TQAATSDVNTQGVLPGMVWQDRDVYLQGGPIWAKI PHTDGHFHSPSLMGGFGLKH-PPP	644
hu.26	SGN#TQAATSDVNTQGVLPGMVWQDRDVYLQGGPIWAKI PHTDGHFHSPSLMGGFGLKH-PPP	644
hu.37	QTN#TGPIVGNVNSQGALPGMVWQNRDVYLQGGPIWAKI PHTDGNFHSPSLMGGFGLKH-PPP	647
hu.51	RGN#RQAATADVNTQGVLPGMVWQDRDVYLQGGPIWAKI PHTDGHFHSPSLMGGFGLKH-PPP	645
hu.53	NSN#TAASTETVNHQGALPGMVWQDRDVYLQGGPIWAKI PHTDGHFHSPSLMGGFGLKH-PPP	644

AAV1	QILIKNTFPVPANPPASFATKFAFSTIQYSTGQVSVLEEWELQKENSKRWNFEVQYTSNY	705
AAV2	QILIKNTFPVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVLEEWELQKENSKRWNFEIQYTSNY	704
AAV3	QIMIKNTFPVPANPPTTFSPAKFASFITQYSTGQVSVLEEWELQKENSKRWNFEIQYTSNY	705
AAV3-3	QIMIKNTFPVPANPPTTFSPAKFASFITQYSTGQVSVLEEWELQKENSKRWNFEIQYTSNY	705
AAV3b	QIMIKNTFPVPANPPTTFSPAKFASFITQYSTGQVSVLEEWELQKENSKRWNFEIQYTSNY	705
AAV4	QIFIKNTFPVPANPATTFSSTPVNSFITQYSTGQVSVQIDWEIQERSKRWNFEVQYTSNY	703
AAV4-4	QIFIKNTFPVPANPATTFSSTPVNSFITQYSTGQVSVQIDWEIQERSKRWNFEVQYTSNY	703
AAV5	QMLIKNTFPVPGN1-TSPSDVPVSSFITQYSTGQVTVEMEWELQKENSKRWNFEIQYTSNY	693
AAV6	QILIKNTFPVPANPPASFATKFAFSTIQYSTGQVSVLEEWELQKENSKRWNFEVQYTSNY	705
AAV7	QILIKNTFPVPANPPEVPTFAKFAFSTIQYSTGQVSVLEEWELQKENSKRWNFEIQYTSNY	706
AAV8	QILIKNTFPVPADPPTTFNQSKLNSFITQYSTGQVSVLEEWELQKENSKRWNFEIQYTSNY	707
AAV9	QILIKNTFPVPADPPTAFNKDKLNSFITQYSTGQVSVLEEWELQKENSKRWNFEIQYTSNY	705
AAV9c	QILIKNTFPVPADPPTAFNKDKLNSFITQYSTGQVSVLEEWELQKENSKRWNFEIQYTSNY	705
rh.10	QILIKNTFPVPADPPTTFQAKLASFITQYSTGQVSVLEEWELQKENSKRWNFEIQYTSNY	707
rh.20	QILIKNTFPVPADPPTTFQAKLASFITQYSTGQVSVLEEWELQKENSKRWNFEIQYTSNY	707
rh.39	QILIKNTFPVPADPPTTFQAKLASFITQYSTGQVSVLEEWELQKENSKRWNFEIQYTSNY	707
rh.73	QILIKNTFPVPADPPTAFNQAKLNSFITQYSTGQVSVLEEWELQKENSKRWNFEIQYTSNY	707
rh.74v1	QILIKNTFPVPADPPTTFQAKLASFITQYSTGQVSVLEEWELQKENSKRWNFEIQYTSNY	707
rh.74v2	QILIKNTFPVPADPPTTFQAKLASFITQYSTGQVSVLEEWELQKENSKRWNFEIQYTSNY	707
hu.12	QIMIKNTFPVPANPPTTFSSAKFASFITQYSTGQVSVLEEWELQKENSKRWNFEIQYTSNY	704
rh.21	QILIKNTFPVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVLEEWELQKENSKRWNFEIQYTSNY	704
hu.26	QILIKNTFPVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVLEEWELQKENSKRWNFEIQYTSNY	704
hu.37	QILIKNTFPVPADPPTTFQAKLASFITQYSTGQVSVLEEWELQKENSKRWNFEIQYTSNY	707
hu.51	QILIKNTFPVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVLEEWELQKENSKRWNFEIQYTSNY	705
hu.53	QIMIKNTFPVPANPPTTFSSAKFASFITQYSTGQVSVLEEWELQKENSKRWNFEIQYTSNY	704
***** * ***** ***** ***** *		

AAV1	AKSANVDFTVDDNNGLYTEFRPIGTRYLTRNL	736	(SEQ ID NO: 59)
AAV2	NKSVNVDFTVDTNGVYSEFRPIGTRYLTRNL	735	(SEQ ID NO: 60)
AAV3	NKSVNVDFTVDTNGVYSEFRPIGTRYLTRNL	736	(SEQ ID NO: 61)
AAV3-3	NKSVNVDFTVDTNGVYSEFRPIGTRYLTRNL	736	(SEQ ID NO: 94)
AAV3B	NKSVNVDFTVDTNGVYSEFRPIGTRYLTRNL	736	(SEQ ID NO: 74)
AAV4	GQQNSLLWAPDAAGKYTEFRAIGTRYLTHHL	734	(SEQ ID NO: 62)
AAV4-4	GQQNSLLWAPDAAGKYTEFRAIGTRYLTHHL	734	(SEQ ID NO: 95)
AAV5	NDFQFVDFAPDSTGEYRTRTRPIGTRYLTRFL	724	(SEQ ID NO: 63)
AAV6	AKSANVDFTVDDNNGLYTEFRPIGTRYLTRNL	736	(SEQ ID NO: 64)
AAV7	EKQFGVDFAVDSQGVYSEFRPIGTRYLTRNL	737	(SEQ ID NO: 65)
AAV8	YKSTNVDFAVNTEGVYSEFRPIGTRYLTRNL	738	(SEQ ID NO: 66)
AAV9	YKSNVVEFAVNTEGVYSEFRPIGTRYLTRNL	736	(SEQ ID NO: 67)
AAV9e	YKSNVVEFAVNTEGVYSEFRPIGTRYLTRNL	736	(SEQ ID NO: 68)
rh.10	YKSTNVDFAVNIDGTYSEFRPIGTRYLTRNL	738	(SEQ ID NO: 69)
rh.20	YKSTNVDFAVNTEGTYSEFRPIGTRYLTRNL	738	(SEQ ID NO: 70)
rh.39	YKSTNVDFAVNTEGTYSEFRPIGTRYLTRNL	738	(SEQ ID NO: 73)
rh.73	YKSTNVDFAVNTEGVYSEFRPIGTRYLTRNL	739	(SEQ ID NO: 75)
rh.74v1	YKSTNVDFAVNTEGTYSEFRPIGTRYLTRNL	738	(SEQ ID NO: 72)
rh.74v2	YKSTNVDFAVNTEGTYSEFRPIGTRYLTRNL	738	(SEQ ID NO: 96)
hu.12	NKSVNVDFTVDTNGVYSEFRPIGTRYLTRNL	735	(SEQ ID NO: 78)
hu.21	NKSVNVDFTVDTNGVYSEFRPIGTRYLTRNL	735	(SEQ ID NO: 77)
hu.26	NKSVNVDFTVDTNGVYSEFRPIGTRYLTRNL	735	(SEQ ID NO: 79)
hu.37	YKSTNVDFAVNTEGTYSEFRPIGTRYLTRNL	738	(SEQ ID NO: 71)
hu.51	NKSVNVDFTVDTNGVYSEFRPIGTRYLTRNL	736	(SEQ ID NO: 76)
hu.53	NKSVNVDFTVDTNGVYSEFRPIGTRYLTRNL	737	(SEQ ID NO: 80)
* * * * *			



Фиг. 8

Фиг. 9А-9С AAV3В- LALGETTRPA (SEQ ID NO: 9)

Фиг. 9А (LALGETTRPA (SEQ ID NO: 9) вставка между N588 и T589)

```

MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWALKPGVP QPKANQQHQD NRRGLVLPGY KYLGPGNGLD
KGEFVNEADA AALEHDKAYD QQLKAGDNPY LKYNHADAEF QERLQEDTSF GGNLGRAVFQ
AKKRILEPLG LVEEAAKTAP GKRPVDQSP QEPDSSSGVG KSGKQPARKR LNFGQTGDSE
SVPDPQPLGE PPAAPTSLGS NTMASGGGAP MADNNEGADG VGNSSGNWHC DSQWLGDRI
TTSTRTWALP TYNNHLYKQI SSQSGASNDN HYFGYSTPFG YFDNRFHCH FSPRDWQRLI
NNNWGFRPKK LSFKLFNIQV KEVTQNDGTT TIANNLTSTV QVFTDSEYQL FYVLGSAHQG
CLPPFPADVF MFPQYGYLTL NNGSQAVGRS SFYCLEYFPS QMLRTGNNFQ FSYTFEDVFF
HSSYAHSQSL DRLMNPLIDQ YLYYLNRTQG TTSGTTNQSR LLFSQAGPQS MSLQARNWLP
GPCYRQQLS KTANDNNNSN FPWTAASKYH LNGRDSLVP GPAMASHKDD EEKFFPMHGN
LIFGKEGTTA SNAELDNVMI TDEEEIRTTN PVATEQYGTV ANNLSNNLA LGETTRPATA
PTTRTVNDQG ALPGMVWQDR DVYLQGPWA KIPHTDGHFH PSFLMGGFGL KHPPFQIMIK
NTPVPANPPT TFSPAKFASF ITQYSTGQVS VEIEWELQKE NSKRWNFEIQ YTSNKNKSVN
VDFTVDTNGV YSEPRPIGTR YLTRNL

```

Фиг. 9В (LALGETTRPA (SEQ ID NO: 9) вставка между A267 и S268)

```

MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWALKPGVP QPKANQQHQD NRRGLVLPGY KYLGPGNGLD
KGEFVNEADA AALEHDKAYD QQLKAGDNPY LKYNHADAEF QERLQEDTSF GGNLGRAVFQ
AKKRILEPLG LVEEAAKTAP GKRPVDQSP QEPDSSSGVG KSGKQPARKR LNFGQTGDSE
SVPDPQPLGE PPAAPTSLGS NTMASGGGAP MADNNEGADG VGNSSGNWHC DSQWLGDRI
TTSTRTWALP TYNNHLYKQI SSQSGALALG ETTRPASNDN HYFGYSTPFG YFDNRFHCH
FSPRDWQRLI NNNWGFRPKK LSFKLFNIQV KEVTQNDGTT TIANNLTSTV QVFTDSEYQL
FYVLGSAHQG CLPPFPADVF MFPQYGYLTL NNGSQAVGRS SFYCLEYFPS QMLRTGNNFQ
FSYTFEDVFF HSSYAHSQSL DRLMNPLIDQ YLYYLNRTQG TTSGTTNQSR LLFSQAGPQS
MSLQARNWLP GPCYRQQLS KTANDNNNSN FPWTAASKYH LNGRDSLVP GPAMASHKDD
EEKFFPMHGN LIFGKEGTTA SNAELDNVMI TDEEEIRTTN PVATEQYGTV ANNLSNNAPT
RTVNDQGALP GMVWQDRDVY LQGPWAKIP HTDGHFHFPF LMGGFGLKHP FPQIMIKNTP
VPANPPTTFP PAKFASFITQ YSTGQVSVEI EWELQKENSX RWNFEIQYTS NYNKNKSVNDF
TVDTNGVYSE PRPIGTRYLT RNL

```

Фиг. 9С (LALGETTRPA (SEQ ID NO: 9) вставка между G454 и T455)

```

MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWALKPGVP QPKANQQHQD NRRGLVLPGY KYLGPGNGLD
KGEFVNEADA AALEHDKAYD QQLKAGDNPY LKYNHADAEF QERLQEDTSF GGNLGRAVFQ
AKKRILEPLG LVEEAAKTAP GKRPVDQSP QEPDSSSGVG KSGKQPARKR LNFGQTGDSE
SVPDPQPLGE PPAAPTSLGS NTMASGGGAP MADNNEGADG VGNSSGNWHC DSQWLGDRI
TTSTRTWALP TYNNHLYKQI SSQSGASNDN HYFGYSTPFG YFDNRFHCH FSPRDWQRLI
NNNWGFRPKK LSFKLFNIQV KEVTQNDGTT TIANNLTSTV QVFTDSEYQL FYVLGSAHQG
CLPPFPADVF MFPQYGYLTL NNGSQAVGRS SFYCLEYFPS QMLRTGNNFQ FSYTFEDVFF
HSSYAHSQSL DRLMNPLIDQ YLYYLNRTQG TTSGLALGET TRPATTTNQSR LLFSQAGPQS
MSLQARNWLP GPCYRQQLS KTANDNNNSN FPWTAASKYH LNGRDSLVP GPAMASHKDD
EEKFFPMHGN LIFGKEGTTA SNAELDNVMI TDEEEIRTTN PVATEQYGTV ANNLSNNNTA
PTTRTVNDQG ALPGMVWQDR DVYLQGPWA KIPHTDGHFH PSFLMGGFGL KHPPFQIMIK
NTPVPANPPT TFSPAKFASF ITQYSTGQVS VEIEWELQKE NSKRWNFEIQ YTSNKNKSVN
VDFTVDTNGV YSEPRPIGTR YLTRNL

```

Фиг. 10A-10C AAVrh73- LALGETTRPA (SEQ ID NO: 9)**Фиг. 10A (LALGETTRPA (SEQ ID NO: 9) вставка между N590 и T591)**

MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWDLKPGAP KPKANQQKQD DGRGLVLPGY KYLGPFNGLD
 KGEPVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNPY LRYNHADAEF QERLQEDTSF GGNLGRAVFQ
 AKKRVLPLEPLG LVEEGAKTAP GKKRPVEPSP QRSPDSSTGI GKKGQQPARK RLNFGQTGDS
 ESVPDPQPLG EPPAAPSSVG SGTMAAGGGA PMADNNEGAD GVGSSSGNWH CDSTWLGDRV
 ITTSTRTWAL PTYNNHLYKQ ISNGTSGGST NDNTYFGYST PWGYFDNRF HCHFSPRDWQ
 RLINNNWGFR PKRLSFKLFN IQVKEVTQNE GTKTIANNLT STIQVFTDSE YQLPYVLGSA
 HQGCLPFFFA DVFMIPQYGY LTLNNGSQAV GRSSFYCLEY FPSQMLRTGN NFSFSYTFED
 VFFHSSYAHS QSLDRLMNPL IDQYLYLSR TQSTGGTAGT QQLLFSQAGP SNMSAQARNW
 LPGPCYRQOR VSTTSLQNNN SNFAWTGATK YHLNGRDSL V NPGVAMATNK DEDRFFPSS
 GILMFGKQGA GKDNVDYSNV MLTSEEEIKT TNPVATEQYG VVADNLQRQN **LALGETTRPATAP**
 IVGAVNSQGA LPGMVWQNRD VYLQGPWAK IPHTDGNFHP SPLMGGFGLK HPPFQILIKN
 TPVPADPPTA FNQAKLNSFI TQYSTGQVSV EIEWELQKEN SKRWNPFIQY TSNYKSTNV
 DFAVNTEGVY SEPRPIGTRY LTRNL

Фиг. 10B (LALGETTRPA (SEQ ID NO: 9) вставка между T270 и N271)

MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWDLKPGAP KPKANQQKQD DGRGLVLPGY KYLGPFNGLD
 KGEPVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNPY LRYNHADAEF QERLQEDTSF GGNLGRAVFQ
 AKKRVLPLEPLG LVEEGAKTAP GKKRPVEPSP QRSPDSSTGI GKKGQQPARK RLNFGQTGDS
 ESVPDPQPLG EPPAAPSSVG SGTMAAGGGA PMADNNEGAD GVGSSSGNWH CDSTWLGDRV
 ITTSTRTWAL PTYNNHLYKQ ISNGTSGGST **LALGETTRPANDN** TYFGYSTPWG YFDNRFHCH
 FSPRDWQRLI NNNWGFRPKR LSFKLFNIQV KEVTQNEGTK TIANNLTSTI QVFTDSEYQL
 PYVLGSAHQG CLPPFPADVF MIPQYGYLTL NNGSQAVGRS SFYCLEYFPS QMLRTGNNFS
 FSYTFEDVVF HSSYAHSQSL DRLMNPLIDQ YLYLSRTQS TGGTAGTQQL LFSQAGPSNM
 SAQARNWLPF PCYRQQRVST TLSQNNNSNF AWTGATKYHL NGRDSLVPNG VAMATNKDDE
 DRFFPSSGIL MFGKQAGKD NVDYSNVMLT SEEEIKTNP VATEQYGVVA DNLQRQNTAP
 IVGAVNSQGA LPGMVWQNRD VYLQGPWAK IPHTDGNFHP SPLMGGFGLK HPPFQILIKN
 TPVPADPPTA FNQAKLNSFI TQYSTGQVSV EIEWELQKEN SKRWNPFIQY TSNYKSTNV
 DFAVNTEGVY SEPRPIGTRY LTRNL

Фиг. 10C (LALGETTRPA (SEQ ID NO: 9) вставка между G456 и G457)

MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWDLKPGAP KPKANQQKQD DGRGLVLPGY KYLGPFNGLD
 KGEPVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNPY LRYNHADAEF QERLQEDTSF GGNLGRAVFQ
 AKKRVLPLEPLG LVEEGAKTAP GKKRPVEPSP QRSPDSSTGI GKKGQQPARK RLNFGQTGDS
 ESVPDPQPLG EPPAAPSSVG SGTMAAGGGA PMADNNEGAD GVGSSSGNWH CDSTWLGDRV
 ITTSTRTWAL PTYNNHLYKQ ISNGTSGGST NDNTYFGYST PWGYFDNRF HCHFSPRDWQ
 RLINNNWGFR PKRLSFKLFN IQVKEVTQNE GTKTIANNLT STIQVFTDSE YQLPYVLGSA
 HQGCLPFFFA DVFMIPQYGY LTLNNGSQAV GRSSFYCLEY FPSQMLRTGN NFSFSYTFED
 VFFHSSYAHS QSLDRLMNPL IDQYLYLSR TQSTG**LALGETT** **RPAG**TAGTQQL LFSQAGPSNM
 SAQARNWLPF PCYRQQRVST TLSQNNNSNF AWTGATKYHL NGRDSLVPNG VAMATNKDDE
 DRFFPSSGIL MFGKQAGKD NVDYSNVMLT SEEEIKTNP VATEQYGVVA DNLQRQNTAP
 IVGAVNSQGA LPGMVWQNRD VYLQGPWAK IPHTDGNFHP SPLMGGFGLK HPPFQILIKN
 TPVPADPPTA FNQAKLNSFI TQYSTGQVSV EIEWELQKEN SKRWNPFIQY TSNYKSTNV
 DFAVNTEGVY SEPRPIGTRY LTRNL

Фиг. 11A-11C AAV8- LALGETTRPA (SEQ ID NO: 9)

MAADGYLPDW	LEDNLSEGIR	EWALKKFGAP	KPKANQQKQD	DGRGLVLPFY	KYLGFENGLD	60
KGEFVNAADA	AALEHDKAYD	QQLQAGDNPY	LRYNHADAEE	QERLQEDTSE	GGNLGRAVEFQ	120
AKKRVLEPLG	LVVECAKTAP	GKKRPVEFSP	QRSPDSSTGI	GKKGQQPARK	RLNFGQTGDS	180
ESVPDFQPLG	EPFAAPSGVG	PNTMAAGGGA	PMADNNEGAD	GVGSSSGNWH	CDSTWLGDRV	240
ITTSTRTWAL	PTYNNHLYKQ	ISNGTSGGAT	NDNTYFGYST	FWGYFDFNRF	HCHFSEPDWQ	300
RLINNNWGFR	PKRLSEKLFN	IQVKEVTQNE	GTAKTIANNLT	STIQVFDTSE	YQLPYVLGSA	360
HQCCLPFFPA	DVFMIPQYCY	LTINNGSQAV	GRSSFYCLEY	FPSQMLRTGN	NEQFTYTFED	420
VFFHSSYAHS	QSLDRLMNPL	IDQYLYYLSR	TQTTGGTANT	QTLGFSQGGF	NIMANQAKNW	480
LPGPCYRQQR	VSTTTGQNNN	SNFAWTAGTK	YHLNGRNSLA	NPGIAMATHK	DDEERFFPSN	540
GILIFGKQNA	ARDNADYSDV	MLTSEEEIKT	TNFVATEEYG	IVADNLQQQN	LALGETTRPATAP	600
QIGTVNSQGA	LPGMVWQNRD	VYLQGPWAK	IPHTDGNFHP	SPLMGGFGLK	HFPFQILIKN	660
TPVPADPPTT	FNQSKLNSFI	TQYSTGQVSV	EIEWELQKEN	SKRWNPEIQY	TSNYYKSTSV	720
DFAVNTEGVY	SEPRPIGTRY	LTRNL (SEQ	ID NO: 146)			

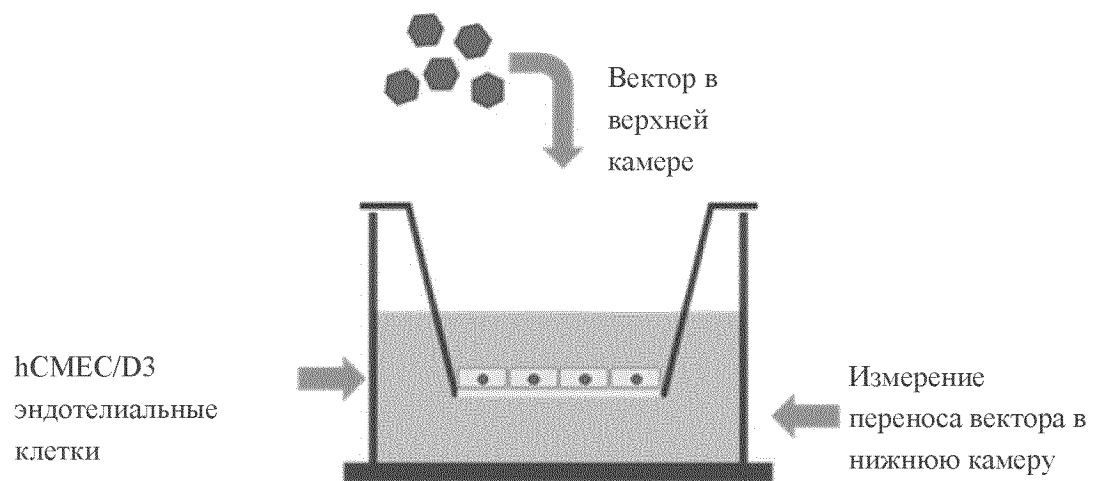
Фиг. 11A (LALGETTRPA (SEQ ID NO: 9) ВСТАВКА МЕЖДУ N590 И T591)

MAADGYLPDW	LEDNLSEGIR	EWALKKFGAP	KPKANQQKQD	DGRGLVLPFY	KYLGFENGLD	60
KGEFVNAADA	AALEHDKAYD	QQLQAGDNPY	LRYNHADAEE	QERLQEDTSE	GGNLGRAVEFQ	120
AKKRVLEPLG	LVVECAKTAP	GKKRPVEFSP	QRSPDSSTGI	GKKGQQPARK	RLNFGQTGDS	180
ESVPDFQPLG	EPFAAPSGVG	PNTMAAGGGA	PMADNNEGAD	GVGSSSGNWH	CDSTWLGDRV	240
ITTSTRTWAL	PTYNNHLYKQ	ISNGTSGGAL	LAL GETTRPAT	NDN TYFGYSTPWG	YFDFNRFHCH	300
ESPRDWQRLL	NNNWGFRPKR	LSEKLFNIQV	KEVTQNEGT	KTIANNLTSTI	QVFDTSEYQL	360
PYVLGSAHQG	CLPFFPADVF	MIPQYGYLTL	NGSQAVGRS	SFYCLEYFES	QMLRTGNNEFQ	420
FTYTFEDVPF	HSSYAHSQSL	DRLMNPLIDQ	YLYYLSRTQT	TGGTANTQTL	GFSQGGPNIM	480
ANQAKNWLPG	PCYRQQRVST	TTGQNNNSNF	AWTAGTKYHL	NGRNSLANFG	IAMATHKDDZ	540
ERFFPSNGIL	IFGKQNAARD	NADYSDVMLT	SEEEIKTTNP	VATEEYGIVA	DNLQQQNTAF	600
QIGTVNSQGA	LPGMVWQNRD	VYLQGPWAK	IPHTDGNFHP	SPLMGGFGLK	HFPFQILIKN	660
TPVPADPPTT	FNQSKLNSFI	TQYSTGQVSV	EIEWELQKEN	SKRWNPEIQY	TSNYYKSTSV	720
DFAVNTEGVY	SEPRPIGTRY	LTRNL (SEQ	ID NO: 147)			

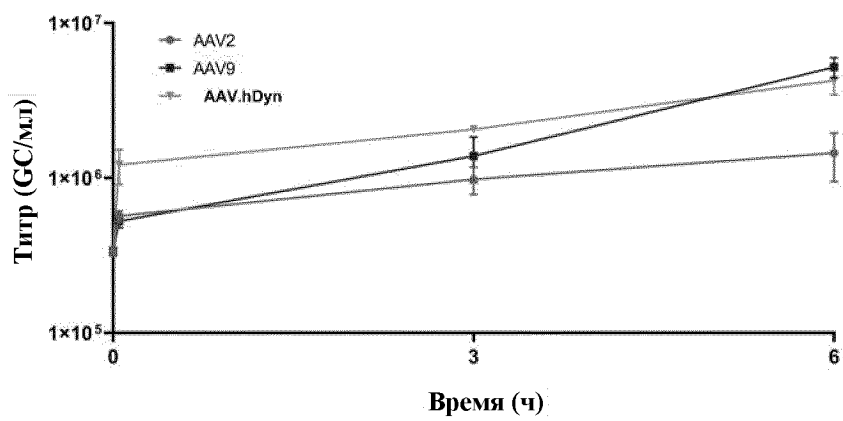
Фиг. 11B (LALGETTRPA (SEQ ID NO: 9) ВСТАВКА МЕЖДУ A269 И T270)

MAADGYLPDW	LEDNLSEGIR	EWALKKFGAP	KPKANQQKQD	DGRGLVLPFY	KYLGFENGLD	60
KGEFVNAADA	AALEHDKAYD	QQLQAGDNPY	LRYNHADAEE	QERLQEDTSE	GGNLGRAVEFQ	120
AKKRVLEPLG	LVVECAKTAP	GKKRPVEFSP	QRSPDSSTGI	GKKGQQPARK	RLNFGQTGDS	180
ESVPDFQPLG	EPFAAPSGVG	PNTMAAGGGA	PMADNNEGAD	GVGSSSGNWH	CDSTWLGDRV	240
ITTSTRTWAL	PTYNNHLYKQ	ISNGTSGGAT	NDNTYFGYST	FWGYFDFNRF	HCHFSEPDWQ	300
RLINNNWGFR	PKRLSEKLFN	IQVKEVTQNE	GTAKTIANNLT	STIQVFDTSE	YQLPYVLGSA	360
HQCCLPFFPA	DVFMIPQYCY	LTINNGSQAV	GRSSFYCLEY	FPSQMLRTGN	NEQFTYTFED	420
VFFHSSYAHS	QSLDRLMNPL	IDQYLYYLSR	TQTL LALGETTRPA	TGGTANTQTL	GFSQGGPNIM	480
ANQAKNWLPG	PCYRQQRVST	TTGQNNNSNF	AWTAGTKYHL	NGRNSLANFG	IAMATHKDDZ	540
ERFFPSNGIL	IFGKQNAARD	NADYSDVMLT	SEEEIKTTNP	VATEEYGIVA	DNLQQQNTAF	600
QIGTVNSQGA	LPGMVWQNRD	VYLQGPWAK	IPHTDGNFHP	SPLMGGFGLK	HFPFQILIKN	660
TPVPADPPTT	FNQSKLNSFI	TQYSTGQVSV	EIEWELQKEN	SKRWNPEIQY	TSNYYKSTSV	720
DFAVNTEGVY	SEPRPIGTRY	LTRNL (SEQ	ID NO: 148)			

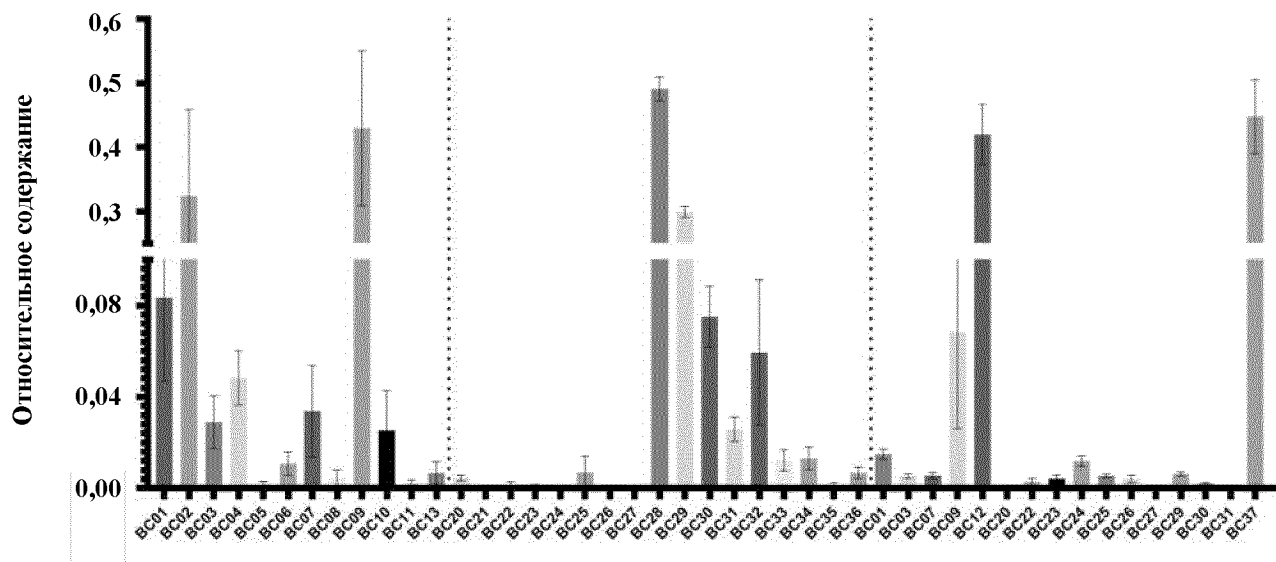
Фиг. 11C (LALGETTRPA (SEQ ID NO: 9) ВСТАВКА МЕЖДУ T453 И T454)



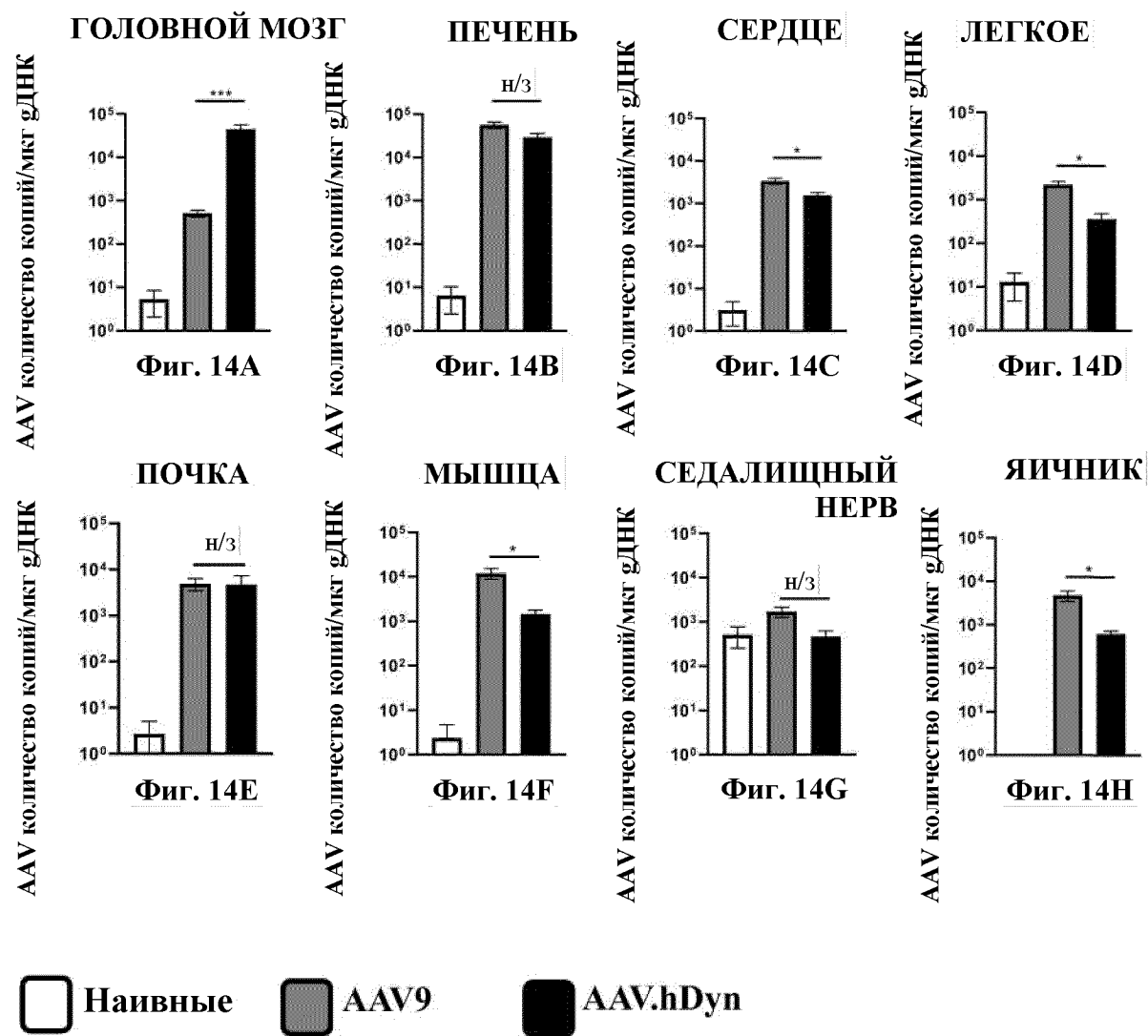
Фиг. 12А

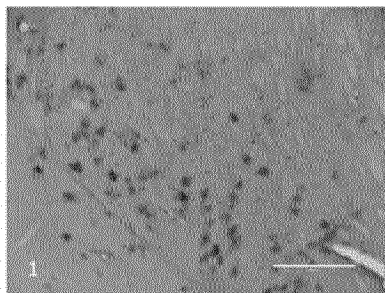


Фиг. 12В

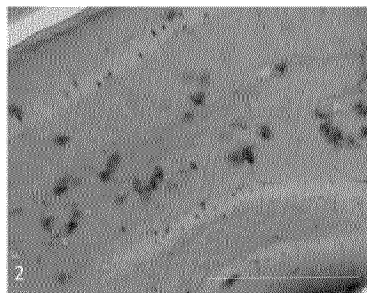


Фиг. 13

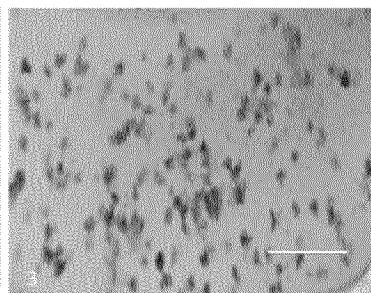




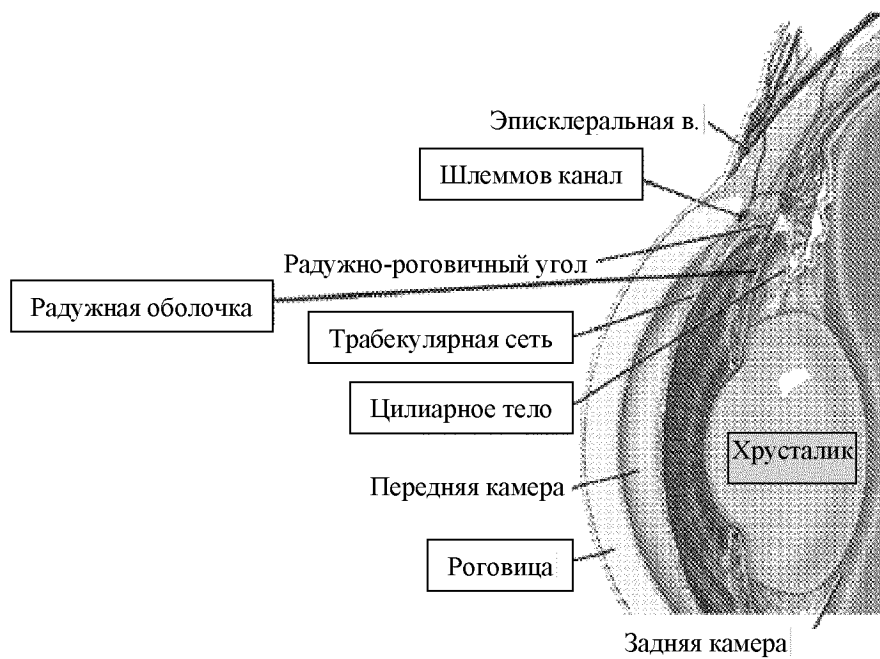
Фиг. 15А



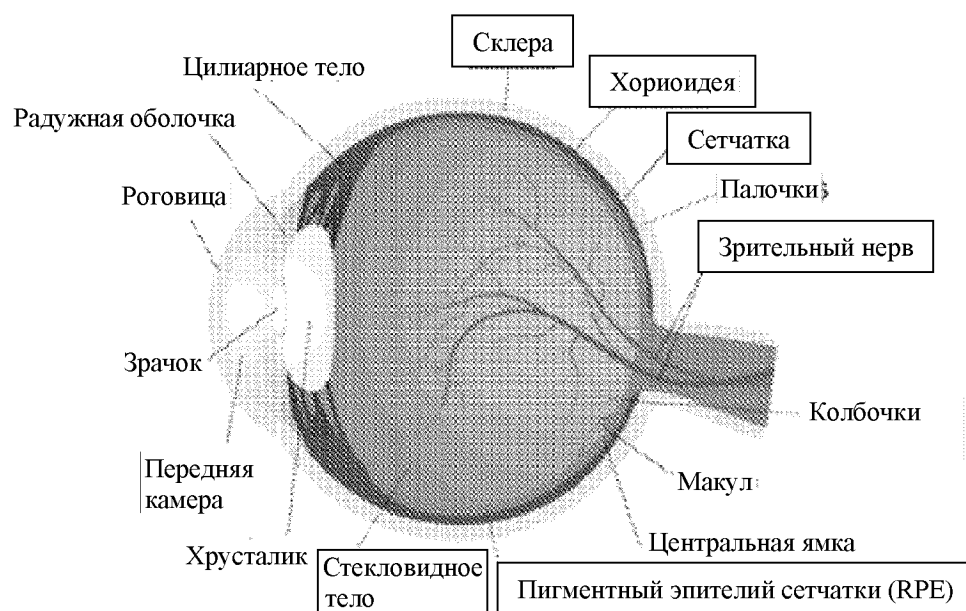
Фиг. 15В



Фиг. 15С



Фиг. 16А

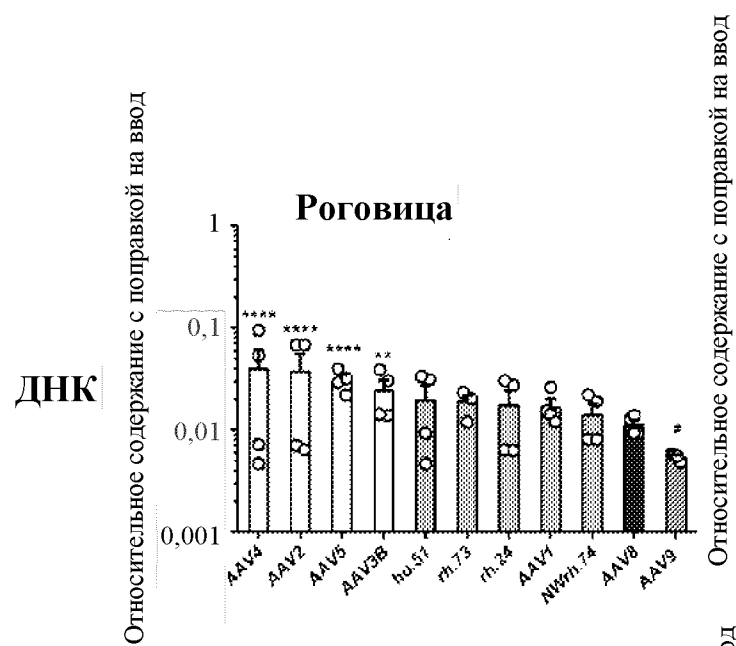


Фиг. 16В

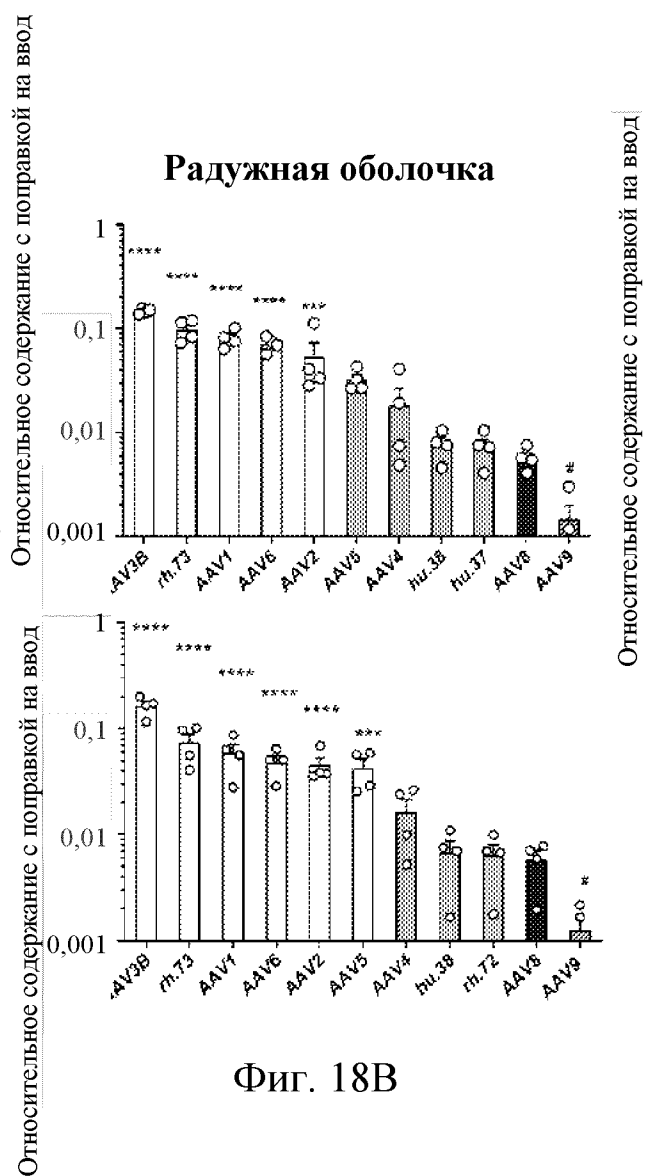
Передний сегмент					Задний сегмент		Зрительный нерв	
Роговица	Радужная оболочка	Цилиарное тело	Шлеммов канал	Трабекулярная сеть	Сетчатка	RPE-хориоидальная оболочка	Зрительный нерв (глазничный сегмент)	Зрительный нерв (черепной сегмент)
AAV4 (180%)	AAV3B (55%)	hu.51 (126%)	AAV4 (119%)	hu.51 (90%)	hu.51 (72%)	AAV3B (130%)	AAV3B (83%)	hu.51 (156%)
AAV4 (173%)	rh73 (54%)	AAV3B (47%)	hu.51 (112%)	AAV4 (58%)	AAV3B (46%)		AAV4 (64%)	AAV4 (114%)
AAV5 (141%)	AAV1 (38%)		AAV1 (104%)	AAV3B (51%)	AAV4 (25%)		hu.51 (49%)	AAV3B (69%)
AAV3B (114%)	AAV5 (28%)		AAV5 (81%)	AAV1 (41%)	AAV5 (24%)			
	AAV6 (25%)							
	hu.51 (23%)							

Фиг. 17А

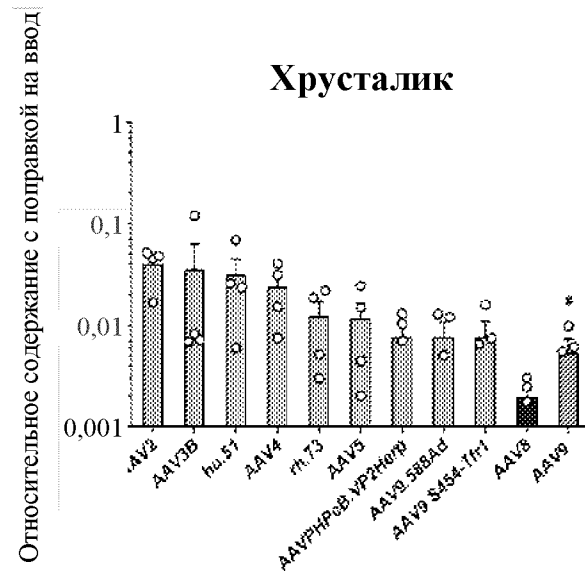
Передний сегмент				Задний сегмент	
Радужная оболочка	Цилиарное тело	Шлеммов канал	Трабекулярная сеть	Сетчатка	RPE-хориоидальная оболочка
AAV3B (50%)	hu.26 (290%)	hu.12 (107%)	AAV1 (1200%)	AAV3B (65%)	AAV3B (190%)
rh73 (20%)	AAV1 (290%)	hu.21 (80%)	hu.26 (1000%)		
AAV1 (17%)	AAV7 (240%)	hu.51 (78%)	AAV7 (950%)		
AAV6 (14%)			AAV9S454-Tr3 (750%)		
AAV2 (13%)			hu.21 (710%)		
AAV5 (12%)			Другие капсиды производные AAV9		



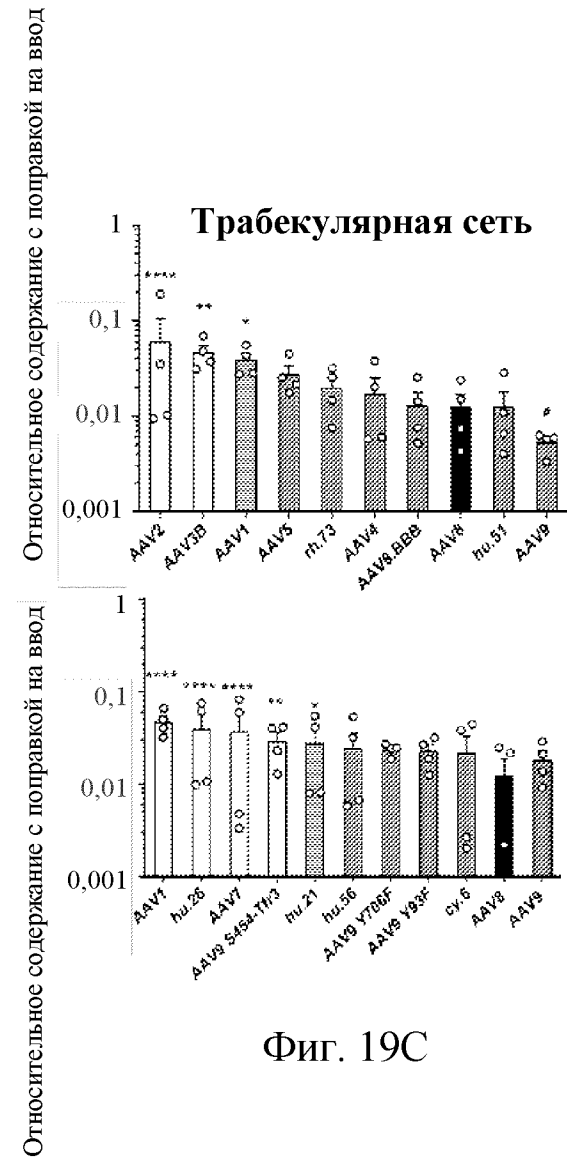
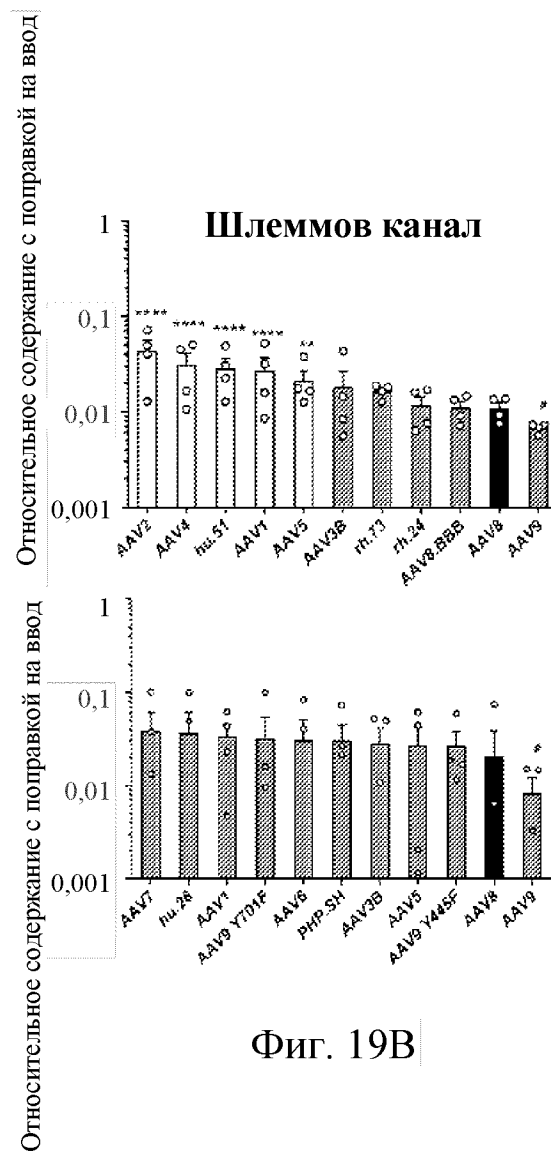
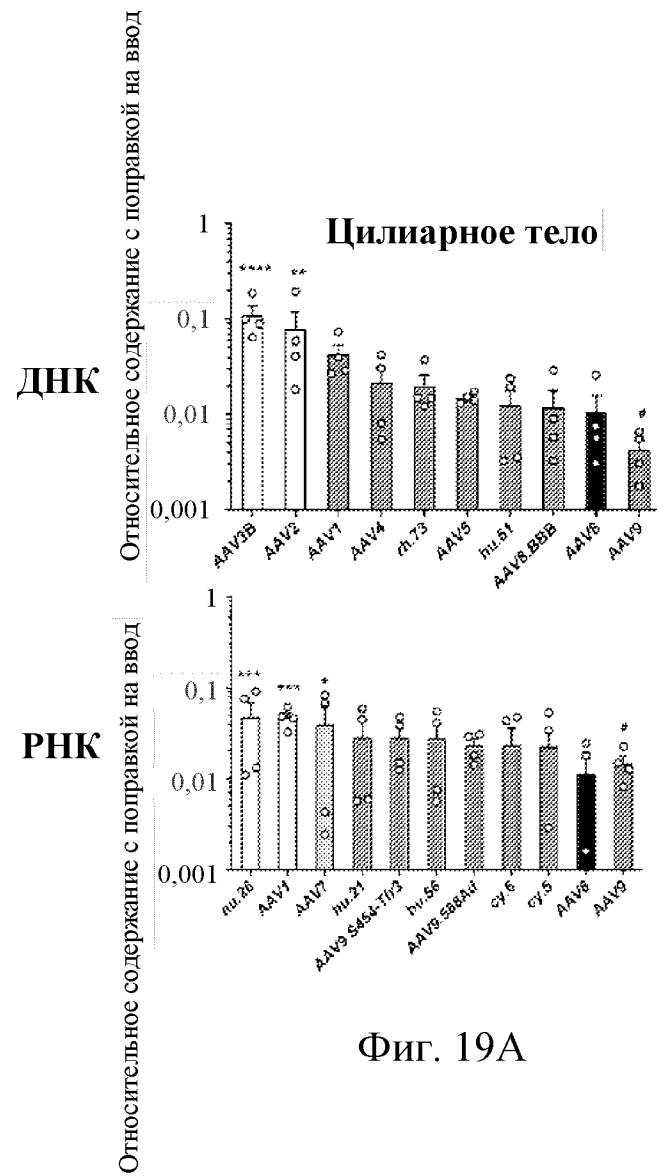
Фиг. 18А



Фиг. 18В

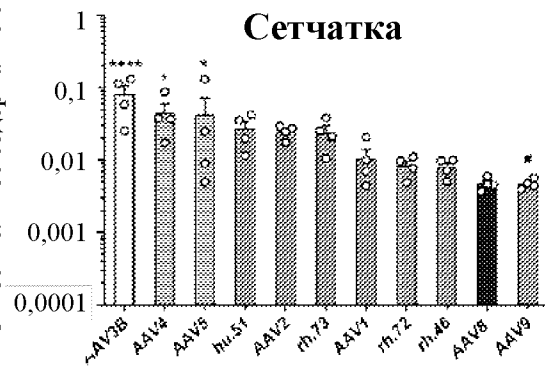


Фиг. 18С



ДНК

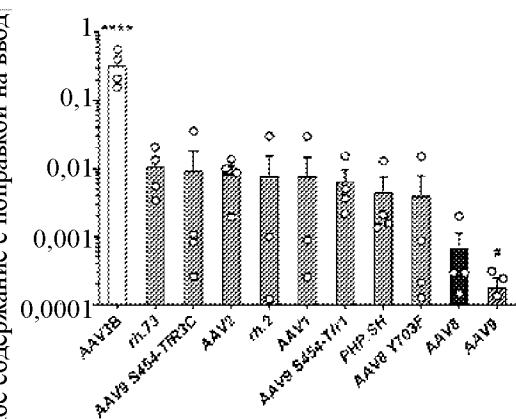
Относительное содержание с поправкой на ввод



Фиг. 20А

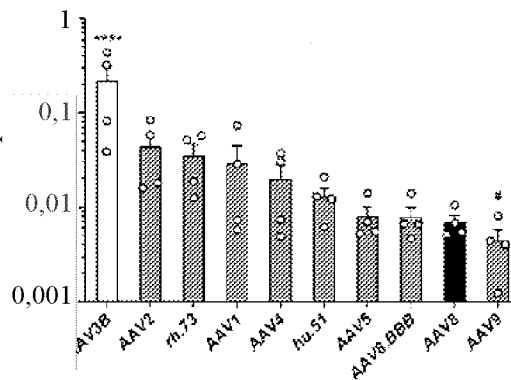
РНК

Относительное содержание с поправкой на ввод



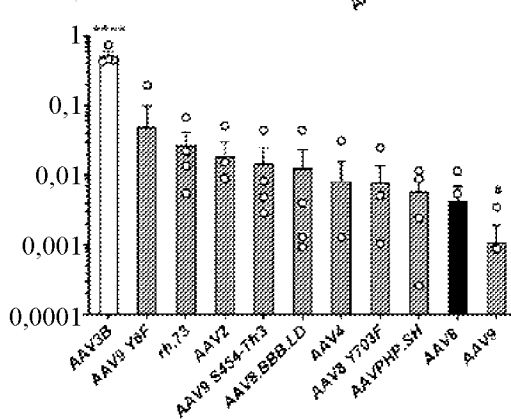
Относительное содержание с поправкой на ввод

RPE-хориоидальная оболочка

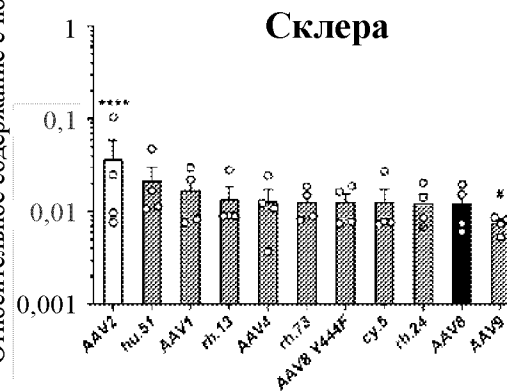


Фиг. 20В

Относительное содержание с поправкой на ввод

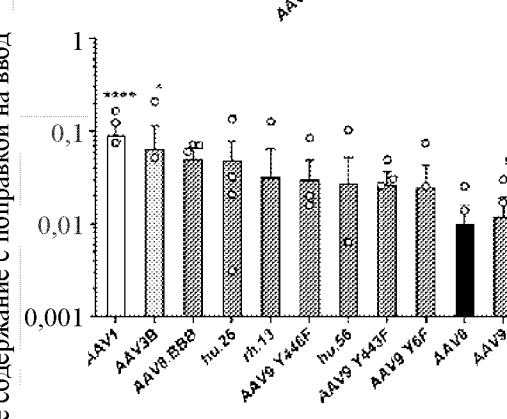


Относительное содержание с поправкой на ввод

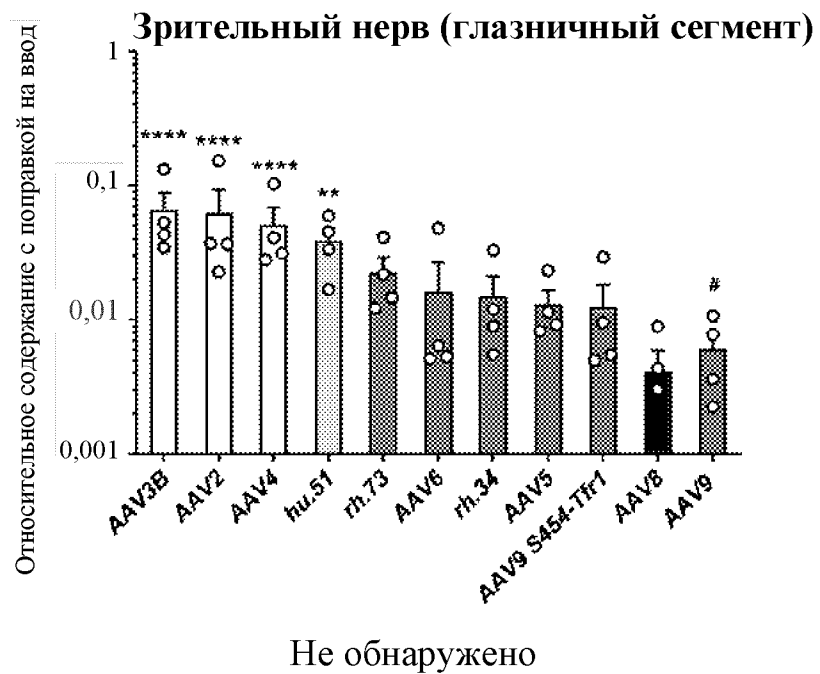


Фиг. 20С

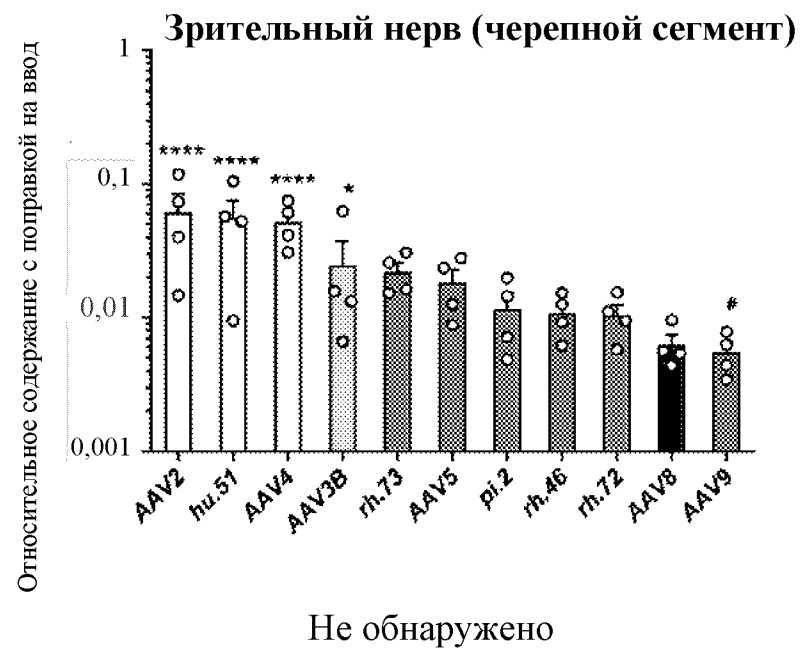
Относительное содержание с поправкой на ввод



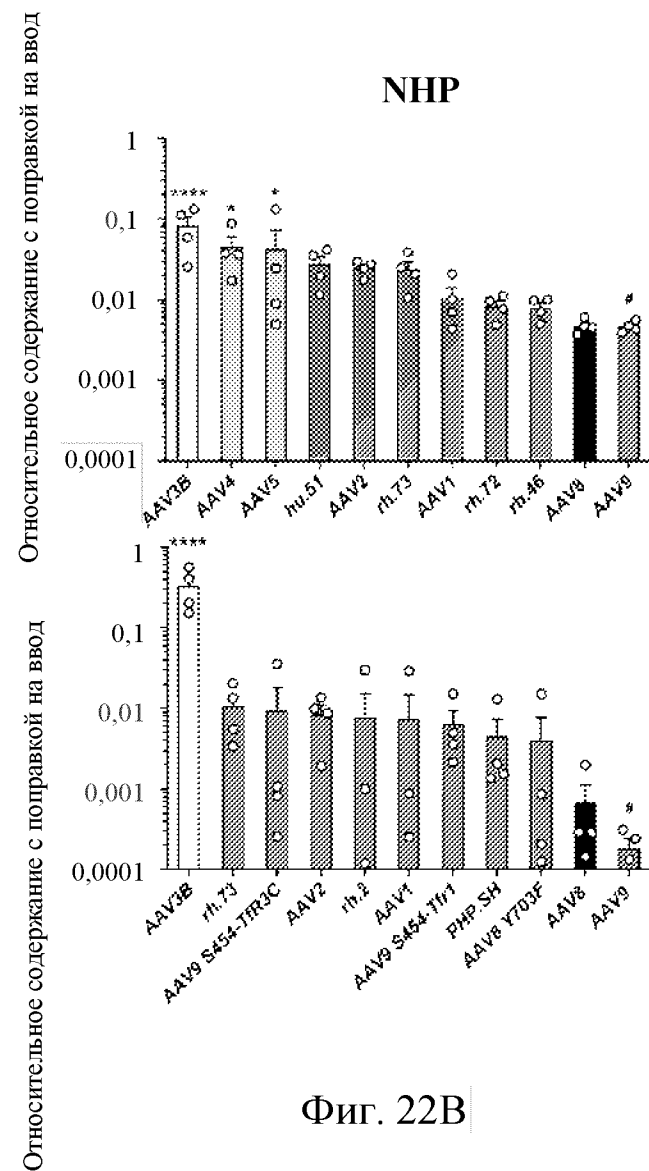
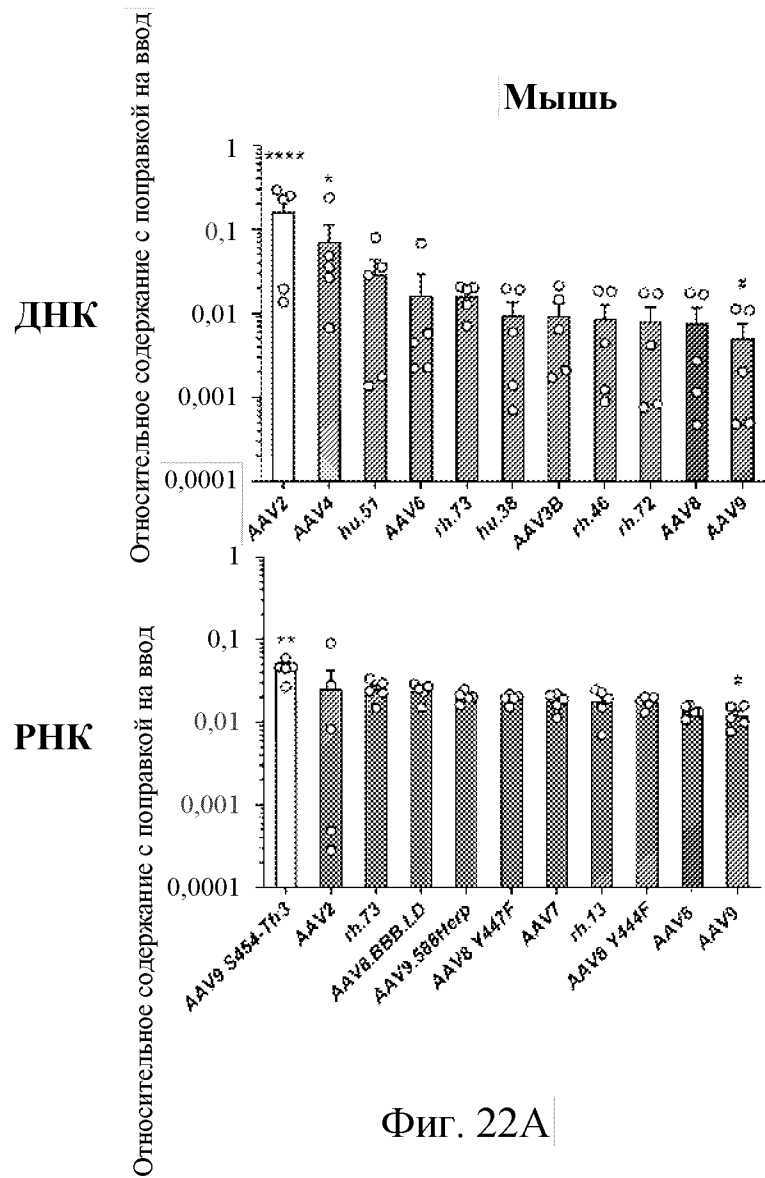
ДНК



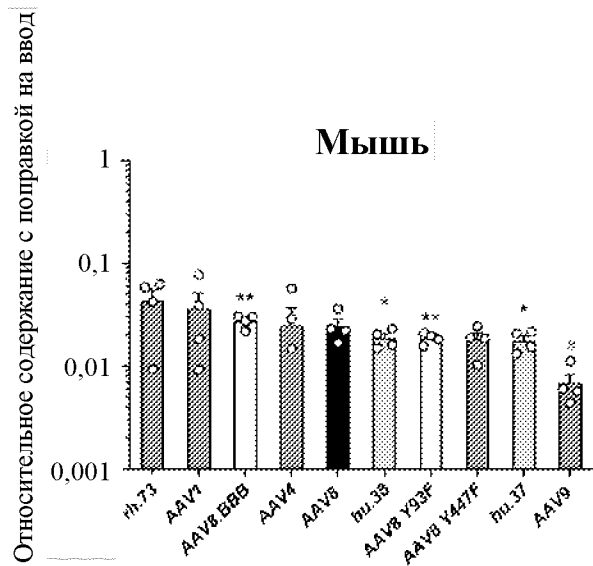
Фиг. 21А



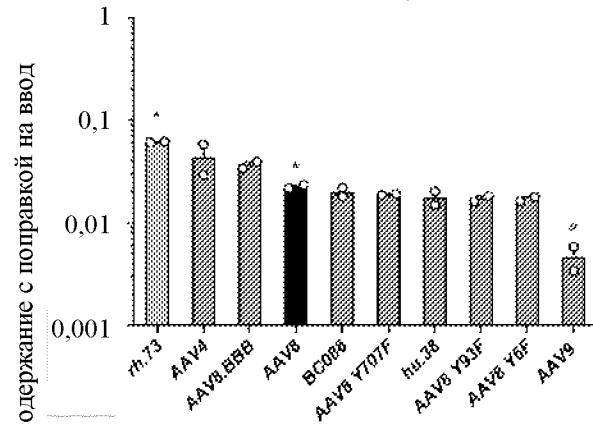
Фиг. 21В



ДНК

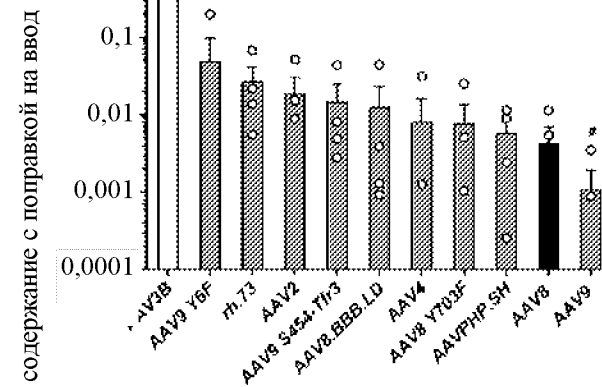
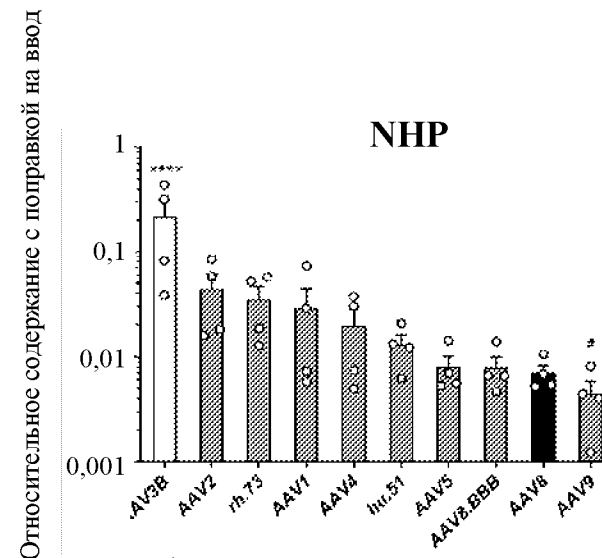


РНК



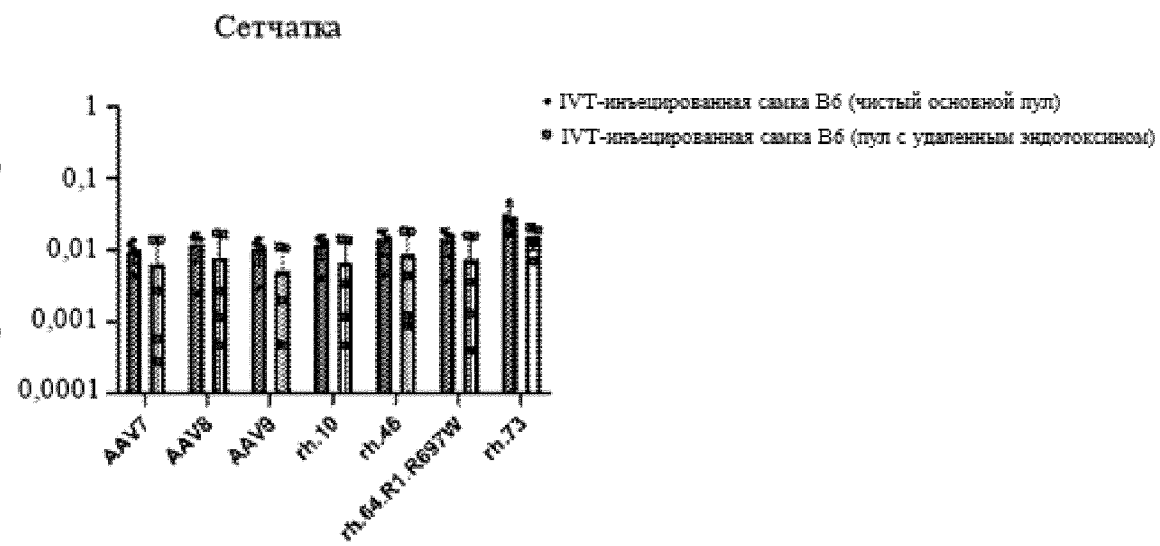
Фиг. 23А

NHP



Фиг. 23В

Относительное содержание с поправкой на ввод



Фиг. 24