

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202390981** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.09.13

(51) Int. Cl. **C07K 14/005** (2006.01)
A61P 21/00 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.10.07

(54) РЕКОМБИНАНТНЫЕ АДЕНОАССОЦИИРОВАННЫЕ ВИРУСЫ ДЛЯ ДОСТАВКИ В ЦНС ИЛИ МЫШЦЫ

(31) **63/088,988**

(32) **2020.10.07**

(33) **US**

(86) **PCT/US2021/054058**

(87) **WO 2022/076750 2022.04.14**

(88) **2022.05.27**

(71) Заявитель:
РИДЖЕНКСБИО ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Данос Оливье, Йост Саманта, Мерсер Эндрю, Лю Е, Брудер Джозеф, Карумутхил-Мелетхил Субха, Фирнберг Элад, Цянь Рэндольф, Тепе Эйприл Р., Эгли Дженнифер М. (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, сконструированные таким образом, чтобы они включали аминокислотные последовательности и/или аминокислотные замены, которые придают и/или усиливают желаемые свойства, в частности повышенную трансдукцию в ЦНС или мышечных клетках, по сравнению с гAAV, имеющими эталонный капсид.

Консенсусные	gAAV
1. Капсид AAV1	YVYVSRITQ - NTGQTAXXQTLLFSSQXGQSNMMAAASNV
2. Капсид AAV2	YVYVSRITQ - NQSSAQNKQDILFSSQSGAGMVAQPPASNV
3. Капсид AAV3	YVYVSRITQ - TPTSTTTQSRKQSSQAGASDTRDQASNV
4. Капсид AAV4	YVYVSRITQ - GTTSTTTNQRSLLFSSQAGQSMMLQASNV
5. Капсид AAV5	YVYVSRITQ - TTTGTTLNAGTATTNFTLRLRDTNFBNFKASNV
6. Капсид AAV6	YVYVSRITQ - NTGQ - - - - - YVYVSRITQ - LAGRYEINTYASNV
7. Капсид AAV7	YVYVSRITQ - NQSSAQNKQDILFSSQSGAGMVAQPPASNV
8. Капсид AAV8	YVYVSRITQ - TTTGTTLNAGTATTNFTLRLRDTNFBNFKASNV
9. Капсид AAV9	YVYVSRITQ - - - - - INGSQGNQDTRKESVAQSNMVAQGNV
10. Капсид AAVrh.10	YVYVSRITQ - STGQTAGTQQLLFSQAGQNNMMAAASNV

202390981
A1

202390981
A1

РЕКОМБИНАНТНЫЕ АДЕНОАССОЦИИРОВАННЫЕ ВИРУСЫ ДЛЯ ДОСТАВКИ В ЦНС ИЛИ МЫШЦЫ

1. ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0001] Настоящее изобретение относится к рекомбинантным аденоассоциированным вирусам (rAAV), имеющим капсидные белки с одной или несколькими аминокислотными заменами и/или пептидными вставками, которые придают и/или усиливают желаемые свойства, включая тропизмы к тканям. В частности, изобретение относится к сконструированным капсидным белкам, содержащим одну или несколько аминокислотных замен или пептидных вставок, которые усиливают тропизм серотипа AAV к одному или нескольким типам тканей, а также к капсидам, которые не являются сконструированными, но, как обнаружено, придают rAAV тропизм к мышцам или ЦНС. В частности, одна или несколько аминокислотных замен и/или вставок в капсиде AAV улучшают трансдукцию, геномную интеграцию и/или экспрессию трансгена в сердечной и/или мышечной ткани или в центральной нервной системе, одновременно снижая тропизм к клеткам печени и/или ганглиев дорсальных корешков и/или периферическим нервным клеткам. rAAV, содержащие описанные в данном документе капсидные белки, применимы для доставки трансгена, кодирующего терапевтический белок, для лечения заболеваний ЦНС или мышц.

2. УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0002] Использование аденоассоциированных вирусов (AAV) в качестве векторов доставки генов является перспективным направлением для лечения многих неудовлетворенных потребностей пациентов. 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 хелперного вируса AAV вызывает латентную инфекцию. Геном AAV обычно имеет ген Rep и ген Cap, окруженные инвертированными концевыми повторами (ITR), которые служат сигналами репликации и упаковки для получения вектора. Капсидные белки образуют капсиды, несущие геномную ДНК, и могут определять тропизм к тканям для доставки ДНК в клетки-мишени.

[0003] Из-за низкой патогенности и перспектив долгосрочной направленной экспрессии генов рекомбинантные AAV (rAAV) использовались в качестве векторов переноса генов, в которых терапевтические последовательности упакованы в различные капсиды. Такие

векторы использовались в доклинических исследованиях генной терапии, и в настоящее время более двадцати продуктов генной терапии находятся на стадии клинической разработки. Рекомбинантные AAV, такие как частицы рекомбинантного AAV9, продемонстрировали желаемые нейротропные свойства, и в настоящее время проводятся клинические испытания с использованием рекомбинантного AAV9 для лечения заболеваний ЦНС. Доставка в сердечную и/или мышечную ткань также желательна. Снижение трансдукции клеток печени и/или ганглиев дорсальных корешков также может быть желательным для снижения токсичности. Однако попытки усилить нейротропные или мышечно-сердечные свойства гAAV у людей имели ограниченный успех.

[0004] Сохраняется потребность в векторах гAAV с усиленными нейротропными свойствами или тропизмом к мышцам и/или сердцу для применения, *например*, при лечении заболеваний, связанных с центральной нервной системой, или там, где желательна экспрессия в сердце и/или мышцах, с минимальной трансдукцией в клетках печени и/или ганглиев дорсальных корешков и/или периферических нервных клетках для сведения к минимуму побочных эффектов. Также существует потребность в векторах гAAV с улучшенным тканеспецифическим нацеливанием и/или усиленной тканеспецифической трансдукцией для доставки терапии.

3. СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0005] В данном изобретении предложены рекомбинантные аденоассоциированные вирусы (гAAV), имеющие капсидные белки, сконструированные таким образом, чтобы иметь одну или несколько аминокислотных замен и/или пептидных вставок, которые усиливают нацеливание на ткани, трансдукцию и/или интеграцию генома гAAV в ЦНС и/или мышечную ткань, по сравнению с эталонным капсидом, например, исходным капсидом или капсидом AAV8 или AAV9, при этом его биораспределение в определенных тканях, таких как клетки печени и ганглиев дорсальных корешков, снижено по сравнению с распределением в ЦНС и/или мышцах, и/или по сравнению с исходным капсидом или эталонным капсидом, таким как капсид AAV8 или AAV9, для снижения токсичности. Исследования биораспределения на мышах и приматах, отличных от человека, позволяют оценить относительную трансдукцию и транскрипцию и экспрессию в тканевых типах капсидов, включая сконструированные капсиды (см. Примеры 13-18 *ниже*). Соответственно, в настоящем документе предложены гAAV с усиленным или повышенным биораспределением, включая трансдукцию, геномную интеграцию, транскрипцию и экспрессию трансгена, в тканях ЦНС (включая лобную кору, гиппокамп, мозжечок, средний мозг) по сравнению с эталонным капсидом (например, несконструированным

исходным капсидом, который был модифицирован, или AAV8 или AAV9), со сниженным распределением, включая трансдукцию, геномную интеграцию, транскрипцию и экспрессию в печени и/или клетках ганглиев дорсальных корешков (шейных, грудных и/или поясничных) по сравнению с биораспределением в ткани ЦНС и/или относительно AAV с эталонным капсидом, таким как исходный капсид или AAV8 или AAV9. Такие rAAV могут быть полезны для доставки терапевтических белков для лечения заболеваний ЦНС. Дополнительно, в настоящем документе предложены rAAV с усиленным или повышенным биораспределением, включая трансдукцию, геномную интеграцию, транскрипцию и экспрессию трансгена, в тканях скелетной мышцы и/или сердечной мышцы по сравнению с эталонным капсидом (например, несконструированным исходным капсидом или AAV8 или AAV9), со сниженным распределением, включая трансдукцию, геномную интеграцию, транскрипцию и экспрессию в печени и/или клетках ганглиев дорсальных корешков (шейных, грудных и/или поясничных) по сравнению с биораспределением в мышечной ткани и/или относительно AAV с эталонным капсидом, таким как исходный капсид или AAV8 или AAV9. Такие rAAV могут быть полезны для доставки терапевтических белков для лечения заболеваний мышц.

[0006] В частности, предложены капсидные белки AAV9 или капсидные белки AAV8 (SEQ ID NO: 67 или 66, соответственно, и пронумерованные как на **Фиг. 7**) или содержащие одну или несколько аминокислотных замен (включая замены 2, 3 или 4 аминокислотные замены), которые предпочтительно (в частности, на более высоком уровне, чем rAAV с капсидом AAV8 или AAV9 дикого типа) трансдуцируются (мишень) в клетки ЦНС и, в некоторых вариантах осуществления, не нацеливаются или не трансдуцируются или имеют сниженную трансдукцию по сравнению с rAAV с капсидами AAV8 или AAV9 дикого типа, в клетки печени и/или ганглиев дорсальный корешков и/или периферические нервные клетки. В других вариантах осуществления предложены капсидные белки AAV9 или капсидные белки AAV8 (SEQ ID NO: 67 или 66 соответственно, и пронумерованные как на **Фиг. 7**), содержащие одну или несколько аминокислотных замен (включая замены 2, 3 или 4 аминокислотные замены), которые предпочтительно (в частности, на более высоком уровне, чем rAAV с капсидом AAV9 дикого типа) трансдуцируются (мишень) в клетки сердца и/или скелетной мышцы и, в некоторых вариантах осуществления, не нацеливаются или не трансдуцируются или имеют сниженную трансдукцию по сравнению с rAAV с капсидами AAV8 или AAV9 дикого типа, в клетки печени и/или ганглиев дорсальный корешков и/или периферические нервные клетки. Такие аминокислотные модификации включают S263F/S269T/A273T в AAV9 и соответствующие замены в капсидах других типов AAV (например, в соответствии с выравниванием на **Фиг. 7**) или W530R, Q474A,

N272A или G266A в AAV9 и соответствующие замены в капсидах других типов AAV или A269S AAV8 и соответствующие замены в капсидах других AAV (например, в соответствии с выравниванием на Фиг. 7). Также предложены капсиды, в частности капсиды AAV9, содержащие пептид TLAAPFK (SEQ ID NO:1), вставленный между Q588 и A589 (здесь PHP.hDYN) или альтернативно между S268 и S269 или между S454 и G455, или вставленный в другой капсид AAV в соответствующем положении (см., например, Фиг. 7). Или, альтернативно, капсид представляет собой капсид PHP.eB AAV9, который имеет модификации A587D и Q588G и вставку пептида TLAVPFK (SEQ ID NO:20) между G588 и A589 и пептида TILSRSTQTG (SEQ ID NO:15) между положениями 138 и 139, или соответствующее. Дополнительные капсиды имеют пептид почки 1 LPVAS, вставленный в капсид, например, между S454 и G455 AAV9, или, альтернативно, между S268 и S269, или между Q588 и A589, или в соответствующем положении другого капсида. В некоторых вариантах осуществления капсиды могут содержать замену R697W в rh64R1 AAV. Капсиды, имеющие эти аминокислотные замены и вставки, могут дополнительно иметь замены NNN (аспарагины) в положениях с 496 по 498 на AAA (аланины) в капсиде AAV9 или в положениях с 498 по 500 в капсиде AAV8, или соответствующие замены в капсидах других типов AAV. Сконструированные капсиды включают AAV8.BB.LD (замены A269S, 498-NNN/AAA-500 в аминокислотной последовательности AAV8, SEQ ID NO 66), AAV9.BB.LD (замены S263G/S269T/A273T, 496-NNN/AAA-498 в аминокислотной последовательности AAV9, SEQ ID NO: 67), AAV9.496-NNN/AAA-498 (SEQ ID NO: 31), AAV9.496-NNN/AAA-498.W503R (SEQ ID NO: 32), AAV9.W503R (SEQ ID NO: 33) или AAV9.Q474A (SEQ ID NO: 34). В других примерах капсид может представлять собой AAV9.N272A.496-NNN-498 (SEQ ID NO:91) или AAV9.G266A.496-NNN-498 (SEQ ID NO:92). В других вариантах осуществления капсид не является сконструированным капсидом, а представляет собой капсид AAVrh.10 (SEQ ID NO: 69), капсид AAVrh.46 (SEQ ID NO: 93), капсид AAVrh.64.R1 (SEQ ID NO: NO: 90) или капсид AAVrh.73 (SEQ ID NO: 88). В некоторых вариантах осуществления трансдукцию измеряют путем обнаружения трансгена, такого как флуоресценция GFP.

[0007] Капсидный белок, который необходимо сконструировать, может быть капсидным белком AAV9, но также может быть капсидным белком любого AAV, такого как AAV серотипа 1 (SEQ ID NO:59); AAV серотипа 2 (SEQ ID NO:60); AAV серотипа 3 (SEQ ID NO:61), AAV серотипа 3B, AAV серотипа 4 (SEQ ID NO:62); AAV серотипа 5 (SEQ ID NO:63); AAV серотипа 6 (SEQ ID NO:64); 451-461 капсида AAV7 (SEQ ID NO:65); 451-461 капсида 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) и AAV серотипа rh74 (SEQ ID NO:72 or SEQ ID NO:80), AAV серотипа rh.34, AAV серотипа hu.60, AAV серотипа rh.21, AAV серотипа rh.15, AAV серотипа rh.24, AAV серотипа hu.5, AAV серотипа hu.10 (SEQ ID NO: 69), AAV серотипа rh64R1 (SEQ ID NO:90), AAV серотипа rh46 (SEQ ID NO:93) и AAV серотипа rh73 (SEQ ID NO: 88) (см. **Фиг. 7** для выравнивания определенных последовательностей) и таблицу 17 для последовательностей. В некоторых вариантах осуществления капсиды этих не являются сконструированными. Например, немодифицированный AAV серотипа rh64R1 (SEQ ID NO:90), AAV серотипа rh.10 ((SEQ ID NO:69) AAV серотипа rh46 (SEQ ID NO:93) и AAV серотипа rh73 (SEQ ID NO:88) может использоваться в описанных способах и композициях.

[0008] В некоторых вариантах осуществления предложены гAAV, включающие сконструированные капсиды, описанные в настоящем документе, включая гAAV с геномами, содержащими трансген, представляющий терапевтический интерес, включая трансген, кодирующий терапевтический белок для лечения заболеваний мышц, сердца или ЦНС. Предложены упаковывающие клетки для получения описанных в данном документе гAAV. Также предложены способ лечения путем доставки и фармацевтические композиции, содержащие сконструированные гAAV, описанные в настоящем документе. Также предложены способы производства гAAV с описанными в данном документе сконструированными капсидами.

[0009] Изобретение проиллюстрировано приведенными *ниже* примерами, описывающими конструкцию капсидов гAAV9, сконструированных с аминокислотными заменами, и анализ распределения в тканях при введении приматам, отличным от человека.

3.1. Варианты осуществления

[0010] 1. Рекомбинантный капсидный белок AAV, содержащий одну или несколько аминокислотных замен по сравнению с капсидным белком дикого типа или несконструированным капсидным белком, в котором капсидный белок гAAV представляет собой капсидный белок AAV9 (SEQ ID NO:67) с заменами S263G/S269R/A273T, G266A замена, замена N272A, замена W503R, замена Q474A, замены 496-NNN/AAA-498, имеет вставку пептида TLAAPFK между Q588 и A589, S268 и S269 или S454 и G455 или представляет собой капсид AAV8 (SEQ ID NO:6) с заменой A269S или заменами 498-NNN/AAA-500, или соответствующими заменами или пептидными вставками в капсидном белке капсида другого типа AAV.

[0011] 2. Рекомбинантный капсидный белок AAV по варианту осуществления 1, дополнительно содержащий аминокислотные замены 498-NNN/AAA-500 в капсидном

белке AAV8 (SEQ ID NO: 66) или аминокислотные замены 496-NNN/AAA-498 в капсидном белке AAV9 (SEQ ID NO:67), или соответствующие замены в капсидном белке капсида другого типа AAV.

[0012] 3. Рекомбинантный капсидный белок AAV по вариантам осуществления 1 или 2, который представляет собой капсид AAV8.BBB.LD (SEQ ID NO: 27), капсид AAV9.BBB.LD (SEQ ID NO: 29), капсид AAV9.496-NNN/AAA-498 (SEQ ID NO: 31), капсид AAV9.496-NNN/AAA-498 (SEQ ID NO: 32), капсид AAV9.W503R (SEQ ID NO: 33), капсид AAV9.Q474A (SEQ ID NO: 34), капсид AAV9.N272A.496-NNN/AAA-498 (SEQ ID NO: 91) или капсид AAV9.N266A.496-NNN/AAA-498 (SEQ ID NO: 92).

[0013] 4. Рекомбинантный капсидный белок AAV по вариантам осуществления 1-3, в котором аминокислотные замены или вставки находятся в капсиде AAV9, включая капсидный белок AAVPHP.eB, или капсиде AAV8.

[0014] 5. Рекомбинантный капсидный белок AAV по варианту осуществления 1 или 2, отличающийся тем, что капсид типа AAV представляет собой AAV rh.34, AAV4, AAV5, AAV hu.26, AAV rh.31, AAV hu.13, AAV hu.26, AAV hu.56, AAV hu.53, AAV7, AAV rh.10, AAV rh.64.R1, AAV rh.46 или AAV rh.73.

[0015] 6. Рекомбинантный капсидный белок AAV по любому из вариантов осуществления 1-5, который при включении в вектор гAAV обеспечивает повышенное нацеливание, трансдукцию или геномную интеграцию в клетки ЦНС по сравнению с вектором гAAV, содержащим соответствующий капсидный белок дикого типа без аминокислотных замен или пептидных вставок.

[0016] 7. Рекомбинантный капсидный белок по варианту осуществления 6, который при включении в вектор гAAV обеспечивает пониженное нацеливание, трансдукцию или геномную интеграцию в клетки печени по сравнению с вектором гAAV, содержащим соответствующий капсидный белок дикого типа без аминокислотных замен или пептидных вставок.

[0017] 8. Рекомбинантный капсидный белок по варианту осуществления 6 или 7, который при включении в вектор гAAV обеспечивает пониженное нацеливание, трансдукцию или геномную интеграцию в клетки ганглии дорсальных корешков по сравнению с вектором гAAV, содержащим соответствующий капсидный белок без аминокислотных замен или пептидных вставок.

[0018] 9. Рекомбинантный капсидный белок по любому из вариантов осуществления 6-8, который при включении в вектор гAAV обеспечивает пониженное нацеливание, трансдукцию или геномную интеграцию в периферические нервные клетки по сравнению с вектором гAAV, содержащим соответствующий капсидный белок без аминокислотных

замен или пептидных вставок.

[0019] 10. Рекомбинантный капсидный белок AAV по любому из вариантов осуществления 1-5, который при включении в вектор gAAV обеспечивает повышенное нацеливание, трансдукцию или геномную интеграцию в клетки сердечной мышцы и/или скелетной мышцы по сравнению с вектором gAAV, содержащим соответствующий капсидный белок без аминокислотных замен или пептидных вставок.

[0020] 11. Рекомбинантный капсидный белок по варианту осуществления 10, который при включении в вектор gAAV обеспечивает пониженное нацеливание, трансдукцию или геномную интеграцию в клетки печени по сравнению с вектором gAAV, содержащим соответствующий капсидный белок без аминокислотных замен или пептидных вставок.

[0021] 12. Рекомбинантный капсидный белок по варианту осуществления 10 или 11, который при включении в вектор gAAV обеспечивает пониженное нацеливание, трансдукцию или геномную интеграцию в клетки ЦНС по сравнению с вектором gAAV, содержащим соответствующий капсидный белок без аминокислотных замен или пептидных вставок.

[0022] 13. Рекомбинантный капсидный белок по любому из вариантов осуществления 10-12, который при включении в вектор gAAV обеспечивает пониженное нацеливание, трансдукцию или геномную интеграцию в клетки ганглии дорсальных корешков по сравнению с вектором gAAV, содержащим соответствующий капсидный белок без аминокислотных замен.

[0023] 14. Нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую капсидный белок gAAV по любому из вариантов осуществления 1-13, или кодирующую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности с ним и сохраняющую биологическую активность капсида.

[0024] 15. Нуклеиновая кислота по варианту осуществления 14, кодирующая капсидный белок gAAV по любому из вариантов осуществления 1-13.

[0025] 16. Упаковывающая клетка, способная экспрессировать нуклеиновую кислоту по варианту осуществления 14 или 15 для получения векторов AAV, содержащих капсидный белок, кодируемый указанной нуклеотидной последовательностью.

[0026] 17. Вектор gAAV, содержащий капсидный белок по любому из варианту осуществления 1-13.

[0027] 18. Вектор gAAV по варианту осуществления 17, дополнительно содержащий трансен, кодирующий терапевтический белок, функционально связанный с регуляторной последовательностью для экспрессии в мышечных клетках и/или клетках ЦНС.

[0028] 19. Фармацевтическая композиция, содержащая вектор gAAV по варианту

осуществления 17 или 18 и фармацевтически приемлемый носитель.

[0029] 20. Способ доставки трансгена в клетку, включающий приведение указанной клетки в контакт с вектором гAAV по варианту осуществления 17 или 18, при этом указанный трансген доставляют в указанную клетку.

[0030] 21. Способ по варианту осуществления 20, в котором клетка представляет собой клетку ЦНС, клетку сердечной мышцы или клетку скелетной мышцы.

[0031] 22. Способ доставки трансгена в ткань-мишень субъекта, нуждающегося в этом, причем указанный способ включает введение указанному субъекту вектора гAAV по варианту осуществления 17 или 18, при этом трансген доставляют в указанную ткань-мишень.

[0032] 23. Способ по варианту осуществления 22, отличающийся тем, что трансген представляет собой терапевтическое средство для лечения заболеваний мышц или заболеваний сердца, а указанная ткань-мишень представляет собой сердечную мышцу или скелетную мышцу.

[0033] 24. Способ по варианту осуществления 23, отличающийся тем, что гAAV вводят системно, в том числе внутривенно или внутримышечно.

[0034] 25. Способ по варианту осуществления 22, отличающийся тем, что трансген представляет собой терапевтическое средство для лечения заболеваний ЦНС, а указанная ткань-мишень представляет собой ЦНС.

[0035] 26. Способ по варианту осуществления 25, отличающийся тем, что гAAV вводят интратекально или интрацеребровентрикулярно.

[0036] 27. Фармацевтическая композиция для доставки трансгена в клетку, причем указанная фармацевтическая композиция содержит вектор гAAV по варианту осуществления 17 или 18, при этом указанный трансген доставляют в указанную клетку.

[0037] 28. Фармацевтическая композиция для доставки трансгена, кодирующего терапевтический белок, в ткань-мишень нуждающегося в этом субъекта, причем указанная фармацевтическая композиция содержит вектор гAAV по варианту осуществления 17 или 18, при этом трансген доставляют в указанную ткань-мишень.

[0038] 29. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 27 или 28, отличающаяся тем, что указанный терапевтический белок представляет собой терапевтическое средство для лечения заболеваний мышц или терапевтическое средство для лечения заболеваний сердца, а указанная ткань-мишень представляет собой сердечную мышцу или скелетную мышцу.

[0039] 30. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 27-29, отличающаяся тем, что гAAV проявляет по меньшей мере в 1,1 раз, 1,5 раза, 2 раза, 3 раза,

4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз или 10 раз большую трансдукцию в клетках сердечной мышцы или скелетной мышцы по сравнению с эталонным капсидом AAV.

[0040] 31. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 27-30, отличающаяся тем, что гAAV демонстрирует по меньшей мере на 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 99% меньшую трансдукцию в печени по сравнению с эталонным капсидом AAV.

[0041] 32. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 27-31, отличающаяся тем, что гAAV демонстрирует по меньшей мере на 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 99% меньшую трансдукцию в клетках ганглий дорсальных корешков по сравнению с эталонным капсидом AAV.

[0042] 33. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 27, 28 или 32, отличающаяся тем, что указанный терапевтический белок представляет собой терапевтическое средство для лечения заболеваний ЦНС, а указанная ткань-мишень представляет собой ЦНС.

[0043] 34. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 27, 28, 32 или 33, отличающаяся тем, что гAAV проявляет по меньшей мере в 1,1 раз, 1,5 раза, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз или 10 раз большую трансдукцию в клетках ЦНС по сравнению с эталонным капсидом AAV.

[0044] 35. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 27, 28, 33 или 34, отличающаяся тем, что гAAV демонстрирует по меньшей мере на 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 99% меньшую трансдукцию в печени по сравнению с эталонным капсидом AAV.

[0045] 36. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 27, 28, 32 или 35, отличающаяся тем, что гAAV демонстрирует по меньшей мере на 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 99% меньшую трансдукцию в клетках ганглий дорсальных корешков по сравнению с эталонным капсидом AAV.

[0046] 37. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 27-36, отличающаяся тем, что эталонный капсид AAV представляет собой AAV8 или AAV9.

[0047] 38. Способ лечения расстройства ЦНС у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции по любому из вариантов осуществления 27, 28, 32-37.

[0048] 39. Способ лечения мышечного расстройства у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции по любому из вариантов осуществления 27-31 и 37.

4. КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0049] **На Фиг. 1** показано сравнение аминокислотных последовательностей капсида, включая петлю VR-IV, аденоассоциированного вируса типа 9 (VR-IV AAV9), от остатков L447 до R476 (с остатками 451-459, заключенными в квадратные скобки), с соответствующими областями других AAV. На Фиг. представлены SEQ ID NO: 49-54, 50 и 55-58, соответственно, в порядке появления. Верхняя последовательность - это консенсусная последовательность, SEQ ID NO:48.

[0050] **На Фиг. 2** показана белковая модель структуры капсида AAV, показывающую переменные области капсида VR-IV, VR-V и VR-VIII. В рамке выделена область петли VR-IV, которая обеспечивает аминокислоты, расположенные на поверхности, как представлено в модели.

[0051] **На Фиг. 3** показана высокая эффективность упаковки (титр) с точки зрения количества геномных копий на мл (ГК/мл) AAV9 дикого типа и восьми (8) модифицированных векторов-кандидатов гAAV9 (1090, 1091, 1092, 1093, 1094, 1095, 1096 и 1097), где каждый из векторов-кандидатов содержит вставку FLAG непосредственно после разных сайтов в VR-IV AAV9, от остатков I451 до Q458, соответственно. Все векторы упаковывали с трансгеном люциферазы в 10 мл культуры; планки погрешностей представляют собой стандартную ошибку среднего.

[0052] **На Фиг. 4** показано расположение на поверхности петли 1VR-IV вставок FLAG в каждом из восьми (8) модифицированных векторов-кандидатов гAAV9 (1090, 1091, 1092, 1093, 1094, 1095, 1096 и 1097), подтвержденное иммунопреципитацией упакованных векторов путем связывания с анти-FLAG смолой.

[0053] **На Фиг. 5A-5B** показана 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) модифицированных (вставленный пептид FLAG) векторов-кандидатов гAAV9 (1090, 1091, 1092, 1093, 1094, 1095, 1096 и 1097); активность трансдукции выражают в процентах активности люциферазы, принимая активность 9-luc за 100% (**Фиг. 5A**), или относительных световых единицах (ОСЕ) на микрограмм белка (**Фиг. 5B**).

[0054] **Фиг. 6A-6E.** **На Фиг. 6A** показана гистограмма, показывающая, что вставки пептида различной длины и состава непосредственно после S454 в AAV9 могут влиять на эффективность продукции частиц AAV в упаковывающей клетке. Десять пептидов разного состава и длины были вставлены после S454 в VR-IV AAV9. кПЦР проводили на собранном супернатанте трансфицированной суспензии клеток HEK293 через пять дней после

трансфекции. Результаты, представленные на гистограмме, демонстрируют, что природа вставок влияет на способность частиц AAV продуцироваться и секретироваться клетками НЕК293, и на это указывает общий выход (титр). (Планки погрешностей представляют собой стандартную ошибку средней длины пептида, которая указана на оси X 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. Капсиды AAV9 дикого типа и со вставкой пептида хоуминга в S454, содержащие трансген GFP, использовали для трансдукции указанных клеточных линий. Вектор P1 не был показан на изображениях из-за чрезвычайно низкой эффективности трансдукции, а вектор P8 не был показан из-за низкого титра. AAV9.S454.FLAG показал низкие уровни трансдукции в каждом исследуемом типе клеток.

[0055] На Фиг. 7 показано выравнивание капсидных последовательностей AAV 1-9e, 3B, rh10, rh20, rh39, rh73, rh74 версии 1 и версии 2, hu12, hu21, hu26, hu37, hu51 и hu53 с сайтами вставок гетерологичных пептидов после кодона инициации 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 показан символом «#» (после аминокислотного остатка 588 в соответствии с нумерацией аминокислот в AAV9).

[0056] На Фиг. 8 показаны копии трансгена GFP (зеленый флуоресцентный белок) в клетках головного мозга мышей после введения векторов AAV: AAV9; AAV.PHP.eB, также упоминается в данном документе как AAV9e (AAV9 с пептидом TLAVPFK (SEQ ID NO:20), вставленным между положениями 588 и 589, и модификациями 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).

[0057] На Фиг. 9A-9C показаны аминокислотные последовательности рекомбинантного вектора AAV9, включающего пептидную вставку TLAAPFK (SEQ ID NO:1) между Q588 и A589 (Фиг. 9A), между S268 и S269 в VR-III (Фиг. 9B), и между S454 и G455 в VR-IV (Фиг. 9C), каждая вставка TLAAPFK (SEQ ID NO:1) выделена жирным шрифтом.

[0058] На Фиг. 10A-10B показан анализ transwell *in vitro* для векторов AAV, пересекающих клеточный слой гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) (Фиг. 10A), и результаты, показывающие, что AAV.hDyn (обозначенный перевернутыми треугольниками) пересекает клеточный слой ГЭБ в анализе быстрее, чем AAV9 (квадраты),

а также быстрее и в большей степени, чем AAV2 (круги) (**Фиг. 10B**).

[0059] На **Фиг. 11** показаны результаты анализа гДНК головного мозга мышей, которым внутривенно вводили пулы сконструированных и нативных капсидов, методом секвенирования следующего поколения (NGS), показывающие относительное содержание в тканях мышей различных капсидов в пуле. Мышам вводили три разных пула. Пунктирные линии указывают, какие векторы были объединены вместе. Исходный AAV9 был включен в каждый пул в качестве контроля (пул 1: BC01, пул 2: BC31, пул 3: BC01). Штрих-коды для каждого капсида из пула перечислены в **Таблицах 6а-6с**.

[0060] На **Фиг. 12А-12Н** показан профиль трансдукции *in vivo* AAV.hDyп у самок мышей C57Bl/6, показывающий количество копий/микрограмм гДНК у наивных мышей или мышей, которым вводили AAV9 или AAV.hDyп в головной мозг (**Фиг. 12А**), печень (**Фиг. 12В**), сердце (**Фиг. 12С**), легкое (**Фиг. 12D**), почку (**Фиг. 12Е**), скелетную мышцу (**Фиг. 12F**), седалищный нерв (**Фиг. 12G**) и яичник (**Фиг. 12H**), где AAV.hDyп показывает повышенное биораспределение в головном мозге по сравнению с AAV9.

[0061] На **Фиг. 13А-13С** показано распределение GFP из AAV.hDyп по всему мозгу, где изображения иммуногистохимического окрашивания срезов мозга из полосатого тела (**Фиг. 13А**), гиппокампа (**Фиг. 13В**), и коры (**Фиг. 13С**) выявили комплексную трансдукцию головного мозга модифицированным вектором.

[0062] На **Фиг. 14** показано соотношение эффективности трансдукции почек и печени *in vivo* для генетически сконструированных векторов AAV9, содержащих вставки пептидов хоуминга непосредственно после аминокислоты 454. Подробная информация о пептидах, использованных в этом исследовании, представлена в **Таблице 6**.

[0063] На **Фиг. 15** показано относительное содержание (ОС) вирусных геномов (нормализованное к введенным) в лобной коре головного мозга модели яванского макака.

[0064] . На **Фиг. 16 и 17** показано ОС (относительное содержание) вирусных геномов (нормализованное к введенным) в гиппокампе и мозжечке модели яванского макака, соответственно. ОС AAV.rh34 показано заштрихованным столбцом в левой части графиков, а ОС эталонного AAV9 показано заштрихованным столбцом в середине графиков. На **Фиг. 16 и 17** показано, что AAV.rh34 является наиболее эффективным капсидом в пуле для внутривенного введения.

[0065] На **Фиг. 18** показана диаграмма Венна: 45 наиболее эффективных исполнений в ЛК (самое высокое ОС для AAV9) и 45 наименее эффективных исполнений в шейных, грудных и поясничных DRG (самое низкое ОС для AAV9), а капсид AAVrh34 показан как единственный капсид, который присутствовал в каждой группе из 45-ти среди пула капсидов.

[0066] **На Фиг. 19** показано ОС вирусных геномов (нормализованное к введенным и к контролю AAV9) в лобной коре головного мозга модели яванского макака.

[0067] **На Фиг. 20** показано относительное содержание (ОС) вирусных геномов (нормализованное к введенным) в гиппокампе модели яванского макака.

[0068] **На Фиг. На Фиг. 21** показано ОС вирусных геномов (нормализованное к введенным) в среднем мозге модели яванского макака.

[0069] **На Фиг. 22** показано ОС вирусных геномов (нормализованное к введенным) в мозжечке модели яванского макака.

[0070] **На Фиг. 23** показано ОС вирусных геномов (нормализованное к введенным) в шейных DRG модели яванского макака.

[0071] **На Фиг. 24** показано ОС вирусных геномов (нормализованное к введенным) в поясничных DRG модели яванского макака.

[0072] **На Фиг. 25** показана диаграмма Венна 15 наиболее эффективных капсидов, трансдуцирующих лобную кору, гиппокамп, средний мозг и мозжечок после ИЦВ введения. Как показано на диаграмме, AAV6, AAV8.BBB, AAV.rh.46 и AAV1 были единственными AAV, представленными в каждой из наиболее эффективных групп.

[0073] **На Фиг. 26** показана диаграмма Венна 45 наиболее эффективных капсидов, трансдуцирующих гиппокамп, и 45 капсидов с самыми низкими значениями трансдукции для DRG, для выявления благоприятных для DRG капсидов, нацеленных на гиппокамп. Как показано на диаграмме, AAV.hu.60, AAV.rh.21, AAV.PHP.hB, AAV.rh.15, AAV.rh.24, AAV9.W503R, hu.5, AAV9.Q474A и AAV.hu.10 были единственными AAV, представленными в каждой из групп.

[0074] **На Фиг. 27** показана диаграмма Венна 40 наиболее эффективных капсидов, трансдуцирующих сердце, бицепс и икроножную мышцу, и 40 капсидов с самыми низкими значениями трансдукции для печени, для выявления капсидов, нацеленных на мышцы, у которых сниженное нацеливание на печень. Как показано на диаграмме, AAV.PHPeB.VP2Negr был единственным AAV, представленным в каждой из групп.

[0075] **На Фиг. 28** показана диаграмма Венна 15 наиболее эффективных капсидов, трансдуцирующих сердце, бицепс и икроножную мышцу.

[0076] **На Фиг. 29А и В** показано ОС (относительное содержание) вирусных геномов (нормализованное к введенным) в икроножной мышце и печени модели яванского макака, соответственно.

[0077] **На Фиг. 30А и 30В** показано количество геномных копий ДНК (А) или РНК (В) выбранных векторов, «не воздействующих на печень» (LD; англ.: liver-detargeting), обнаруженных в печени NHP после в/в введения библиотеки капсидов.

[0078] На Фиг. 31 показано биораспределение выбранных векторов, «не воздействующих на печень» (LD), по сравнению с их исходным капсидом AAV9 в различных тканях у NHP после в/в введения библиотеки капсидов.

[0079] На Фиг. 32 показано биораспределение выбранных LD-векторов по сравнению с их исходным капсидом AAV8 в различных тканях у NHP после в/в введения библиотеки капсидов.

[0080] Фиг. 33А и 33В. На Фиг. 33А показано изменение относительного содержания точечных мутаций, влияющих на трансдукцию AAV9 (или трансдукцию печени), по сравнению с AAV9. Четыре мутанта, представленные в этом исследовании, демонстрируют удержание в крови по сравнению с AAV9 дикого типа. На Фиг. 33В показано изменение относительного содержания мутантов AAV8 и AAV9, сочетающих мутацию NNN/AAA с транспортным мотивом ГЭБ (A269S в AAV8; S263G/S269T/A273T в AAV9), по сравнению с исходным капсидом (AAV8 или AAV9, соответственно).

[0081] Фиг. 34А и Фиг. 34В. На Фиг. 34А показано увеличение удержания в крови 3-24 часа по сравнению с AAV9. На Фиг. 34В показано увеличение удержания в крови 3-24 часа по сравнению с исходным AAV.

[0082] На Фиг. 35 показано биораспределение выбранных векторов AAV в мышечных тканях, включая сердечную мышцу, а также в головном мозге, печени и поджелудочной железе у мышей В6 дикого типа после в/в введения библиотеки капсидов.

[0083] На Фиг. 36А-36Н показано биораспределение различных капсидов у мышей В6 дикого типа по сравнению с биораспределением в тканях мышей mdx.

5. ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0084] В данном документе предложены рекомбинантные аденоассоциированные вирусы (гAAV), имеющие капсидные белки, сконструированные по сравнению с эталонным капсидным белком, так что гAAV обладает улучшенными желаемыми свойствами, такими как повышенное нацеливание на ткани, включая трансдукцию, геномную интеграцию и экспрессию трансгена, в частности, предпочтительно, относительно эталонного капсидного белка (например, несконструированного капсида или капсида дикого типа), на ЦНС или на сердечную ткань и/или ткань скелетных мышц. В вариантах осуществления сконструированный капсид обладает пониженным тропизмом (т. е. нацеливанием на ткани, трансдукцией и геномной интеграцией гAAV) по сравнению с эталонным капсидом в отношении печени, ганглий дорсальных корешков и/или периферической нервной ткани для снижения токсичности генной терапии AAV. Модификации включают аминокислотные замены (в том числе 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 аминокислотных замен) и/или

пептидные вставки (от 4 до 20, или 7 смежных аминокислот, а в вариантах осуществления не более 12 смежных аминокислот из гетерологичного белка), как описано в настоящем документе. Капсидный белок AAV, который необходимо сконструировать, в некоторых вариантах осуществления представляет собой капсидный белок AAV9 или капсидный белок AAV8. В других вариантах осуществления капсид AAV, который необходимо сконструировать, представляет собой капсидный белок AAV rh.34, AAV4, AAV5, AAV hu.26, AAV rh.31, AAV hu.13, AAV hu.56, AAV hu.53, AAV7, AAV rh64R1, AAV rh46 или AAV rh73. (См. последовательности на Фиг. 7 и в таблице 17)

[0085] Соответственно, предложены сконструированные капсиды, содержащие одну или несколько аминокислотных замен, которые способствуют трансдукции и/или тропизму к тканям, в частности, для усиленного по сравнению с несконструированным капсидом нацеливания на сердце и/или скелетную мышцу и, в некоторых вариантах осуществления, пониженного по сравнению с несконструированным капсидом нацеливания на печень, ганглии дорсальных корешков и/или периферическую нервную ткань. В вариантах осуществления аминокислотные замены представляют собой S263F/S269T/A273T AAV9 и соответствующие замены в капсидах других типов AAV (например, в соответствии с выравниванием на Фиг. 7), или W530R, Q474A, N272A или G266A AAV9 и соответствующие замены в капсидах других типов AAV, или A269S в AAV8 и соответствующие замены в капсидах других AAV (например, в соответствии с выравниванием на Фиг. 7). Также предложены капсиды, в частности капсиды AAV9, содержащие пептид TLAAPFK (SEQ ID NO:1), вставленный между Q588 и A589 (здесь PHP.hDYN) или альтернативно между S268 и S269 или между S454 и G455, или вставленный в другой капсид AAV в соответствующем положении (см., например, Фиг. 7). Или, альтернативно, капсид представляет собой капсид PHP.eB AAV9, который имеет модификации A587D и Q588G и вставку пептида TLAVPFK (SEQ ID NO:20) между G588 и A589 и пептида TILSRSTQTG (SEQ ID NO:15) между положениями 138 и 139, или соответствующее. Дополнительные капсиды имеют пептид почки 1 LPVAS, вставленный в капсид, например, между S454 и G455 AAV9, или, альтернативно, между S268 и S269, или между Q588 и A589, или в соответствующем положении другого капсида. В некоторых вариантах осуществления капсиды могут содержать замену R697W в rh64R1 AAV. Капсиды, имеющие эти аминокислотные замены и вставки, могут дополнительно иметь замены NNN (аспарагины) в положениях с 496 по 498 на AAA (аланины) в капсиде AAV9 или в положениях с 498 по 500 в капсиде AAV8, или соответствующие замены в капсидах других типов AAV. Сконструированные капсиды включают AAV8.BB.LD (замены A269S, 498-NNN/AAA-500 в аминокислотной последовательности AAV8, SEQ ID NO 66),

AAV9.BB.LD (замены S263G/S269T/A273T, 496-NNN/AAA-498 в аминокислотной последовательности AAV9, SEQ ID NO: 67), AAV9.496-NNN/AAA-498 (SEQ ID NO: 31), AAV9.496-NNN/AAA-498.W503R (SEQ ID NO: 32), AAV9.W503R (SEQ ID NO: 33) или AAV9.Q474A (SEQ ID NO: 34). В других примерах капсид может представлять собой AAV9.N272A.496-NNN-498 (SEQ ID NO:91) или AAV9.G266A.496-NNN-498 (SEQ ID NO:92). В других вариантах осуществления капсид не является сконструированным капсидом, а представляет собой капсид AAVrh.10 (SEQ ID NO: 69), капсид AAVrh.46 (SEQ ID NO: 93), капсид AAVrh.64.R1 (SEQ ID NO: 90) или капсид AAVrh.73 (SEQ ID NO: 88). В некоторых вариантах осуществления трансдукцию измеряют путем обнаружения трансгена, такого как флуоресценция GFP. Капсиды, имеющие эти аминокислотные замены и вставки, могут дополнительно иметь замены NNN (аспарагины) в положениях с 496 по 498 на AAA (аланины) в капсиде AAV9, или соответствующие замены в капсидах других типов AAV. Этот сконструированный капсид может проявлять преимущественное нацеливание на сердце и/или скелетную мышцу и пониженное нацеливание (по сравнению с AAV, несущим немодифицированный капсид) на клетки печени и/или ганглиев дорсальных корешков и/или ткань периферической нервной системы, и может быть особенно полезен для доставки трансгена, кодирующего терапевтический белок, для лечения заболевания мышц.

[0086] В другом варианте осуществления предложен рекомбинантный капсидный белок, включая сконструированный капсидный белок AAV9, и rAAV, содержащий капсидный белок, в котором пептид TLAVPFK (SEQ ID NO:20) вставлен между G588 и A589 в AAV9, и, в частности, капсидный белок также имеет аминокислотные замены A587D/Q588G (PHP.eB) и, кроме того, имеет пептид TILSRSTQTG (SEQ ID NO:15), вставленный после положения 138 в AAV9 (в совокупности AAVPHPeB.VP2Herp; см. Таблицу 17), или в соответствующих положениях другого AAV. Дополнительные капсиды содержат пептид почки 1 LPVAS (SEQ ID NO:6) (или, альтернативно, CLPVASC (SEQ ID NO:5)), вставленный в капсид, например, между S454 и G455 AAV9 (см. Таблицу 17), или, альтернативно, между S268 и S269 или между Q588 и A589, или в соответствующем положении другого капсида. Такой сконструированный капсид может проявлять преимущественное нацеливание на сердце и скелетную мышцу и пониженное нацеливание (по сравнению с AAV, имеющим немодифицированный капсид) на клетки печени и/или ганглиев дорсальных корешков, и может быть особенно полезен для доставки трансгена, кодирующего терапевтический белок, для лечения заболевания мышц (например, мышечной дистрофии, но не ограничиваясь этим).

[0087] В вариантах осуществления сконструированный rAAV проявляет по меньшей

мере в 1,1 раз, 1,5 раза, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз или 10 раз большую трансдукцию в клетках сердечной мышцы и/или скелетной мышцы по сравнению с эталонным капсидом AAV, включая капсид AAV9 или капсид AAV8, или исходный капсид. В конкретных вариантах осуществления мышца представляет собой икроножную мышцу, двуглавую мышцу, трехглавую мышцу и/или сердечную мышцу. В дополнительных вариантах осуществления сконструированный гAAV демонстрирует на 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 99% меньшую трансдукцию в печени по сравнению с эталонным капсидом AAV, включая капсид AAV9 или капсид AAV8, или исходный капсид. В дополнительных вариантах осуществления гAAV демонстрирует на 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 99% меньшую трансдукцию в клетках ганглий дорсальных корешков (в том числе в клетках шейных, грудных или поясничных DRG; англ.: dorsal root ganglion) по сравнению с эталонным капсидом AAV. Усиление и/или понижение трансдукции может происходить при любом способе введения, внутривенном введении, внутримышечном введении или любом типе системного введения, интратекальном введении или ИЦВ-введении.

[0088] Также предложены сконструированные капсиды, содержащие одну или несколько аминокислотных замен, которые способствуют трансдукции и/или тропизму к тканям, в частности, для усиленного по сравнению с несконструированным капсидом нацеливания на ЦНС и, в некоторых вариантах осуществления, пониженного по сравнению с несконструированным капсидом нацеливания на печень, ганглии дорсальных корешков и/или периферическую нервную ткань. В вариантах осуществления аминокислотные замены представляют собой A269S в AAV8 (или в соответствующем положении в капсиде AAV другого серотипа), S263G/S269T/A273T в AAV9 (или в соответствующем положении в капсиде AAV другого серотипа), N272A или N266A в капсиде AAV9 (или в соответствующем положении в капсиде AAV другого серотипа), Q474A в AAV9 (или в соответствующем положении в капсиде AAV другого серотипа), или W503R в AAV9 (или в соответствующем положении в капсиде AAV другого серотипа), или R697W в rh64R1 (или в соответствующем положении в капсиде AAV другого серотипа). Капсиды, содержащие эти аминокислотные замены и вставки, могут дополнительно иметь или альтернативно иметь замены NNN (аспарагины) в положениях 496-498 на AAA (аланины) в капсиде AAV9 (SEQ ID NO: 67) или иметь замены NNN (аспарагины) в положениях 498-4500 на AAA (аланины) в капсиде AAV8 (SEQ ID NO: 66), или соответствующие замены в капсидах других типов AAV. Этот сконструированный капсид может проявлять преимущественное нацеливание на ЦНС и пониженное нацеливание (по сравнению с AAV, несущим немодифицированный капсид) на клетки печени и/или ганглиев дорсальных

корешков и/или ткань периферической нервной системы, и может быть особенно полезен для доставки трансгена, кодирующего терапевтический белок, для лечения заболевания ЦНС.

[0089] Также предусмотрены рекомбинантные капсидные белки и содержащие их гAAV, которые содержат вставленные пептиды, которые нацеливают и/или способствуют клеточному поглощению, трансдукции и/или геномной интеграции гAAV в ткани ЦНС и, в некоторых вариантах осуществления, имеют сниженную по сравнению с немодифицированным капсидом способность нацеливаться на печень, ганглии дорсальных корешков и/или периферическую нервную ткань, например, пептид TILSRSTQTG (SEQ ID NO:15); TLAVPFK (SEQ ID NO:20); или TLAAPFK (SEQ ID NO:1). В конкретных вариантах осуществления пептид TLAAPFK (SEQ ID NO:1) вставлен между Q588 и A589 в AAV9 (AAV9.hDyn; см. Таблицу 17) или в соответствующем положении другого AAV (см. Фиг. 7). В качестве альтернативы капсид представляет собой rh.34, rh.10, rh.46, rh.73 или rh64.R1 (последовательность на Фиг. 7 или в Таблице 17) или сконструированную форму rh.34, rh.10, rh.46, rh.73 или rh64.R1. Такие сконструированные капсиды могут проявлять преимущественное нацеливание на ЦНС и пониженное нацеливание (по сравнению с AAV, несущим немодифицированный капсид) на клетки печени и/или ганглиев дорсальных корешков и/или ткань периферической нервной системы, и могут быть особенно полезны для доставки трансгена, кодирующего терапевтический белок, для лечения заболевания ЦНС.

[0090] В вариантах осуществления сконструированный гAAV проявляет по меньшей мере в 1,1 раз, 1,5 раза, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, в 9 раз или в 10 раз большую трансдукцию в ткани ЦНС по сравнению с эталонным капсидом AAV, таким как исходный капсид или AAV8, или AAV9. Ткань ЦНС может быть одной или несколькими из лобной коры, гиппокампа, мозжечка, среднего мозга и/или заднего мозга. В дополнительных вариантах осуществления сконструированный гAAV демонстрирует на 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 99% меньшую трансдукцию в печени по сравнению с эталонным капсидом AAV, таким как исходный капсид или AAV8, или AAV9. В дополнительных вариантах осуществления гAAV демонстрирует на 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 99% меньшую трансдукцию в клетках ганглий дорсальных корешков (в том числе в клетках шейных, грудных или поясничных DRG) по сравнению с эталонным капсидом AAV, таким как исходный капсид или AAV8, или AAV9. Усиление и/или понижение трансдукции может происходить при любом способе введения, внутривенном введении, внутримышечном введении или любом типе системного введения, интратекальном введении или ИЦВ-введении.

[0091] Также предложены рекомбинантные векторы, содержащие капсидные белки, наряду с их фармацевтическими композициями, нуклеиновыми кислотами, кодирующими капсидные белки, и способами получения и применения капсидных белков и векторов гAAV, содержащих сконструированные капсиды, для адресной доставки, улучшенной трансдукции и/или лечения расстройств, связанных с тканью-мишенью.

[0092] Используемый по тексту термин «серотип» AAV относится к AAV, имеющему иммунологически отличный капсид, природный капсид или сконструированный капсид.

5.1. Определения

[0093] Термин «AAV» или «аденоассоциированный 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 геном сар, и/или из генома гAAV, упакованного в капсид, содержащий капсидные белки, кодируемые не встречающимся в природе капсидным геном сар. Пример последнего включает гAAV, имеющий капсидный белок, содержащий пептидную вставку в аминокислотную последовательность встречающегося в природе капсида.

[0094] Термин «гAAV» относится к «рекомбинантному AAV». В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный AAV имеет геном AAV, в котором часть или все гены гер и сар заменены гетерологичными последовательностями.

[0095] Термин «хелперная плазида гер-сар» относится к плазмиде, которая обеспечивает функцию вирусных генов гер и сар и способствует продукции AAV из геномов гAAV, в которых отсутствуют функциональные последовательности генов гер и/или сар.

[0096] Термин «ген сар» относится к последовательностям нуклеиновых кислот, которые кодируют капсидные белки, которые формируют или помогают формировать капсидную оболочку вируса. Для AAV капсидным белком может быть VP1, VP2 или VP3.

[0097] Термин «ген гер» относится к последовательностям нуклеиновых кислот, которые кодируют неструктурный белок, необходимый для репликации и продукции вируса.

[0098] Используемые в данном документе 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 использованием, *например*, аналогов нуклеотидов, которые включают инозин или тритилированные основания, но не ограничиваются ими. 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.

[0099] Используемые в данном документе термины «субъект», «хозяин» и «пациент» используются взаимозаменяемо. В данном контексте субъект представляет собой млекопитающее, например, отличное от приматов (*например*, коровы, свиньи, лошади, кошки, собаки, крысы и т. д.) или такое как примат (*например*, обезьяна и человек), или, в некоторых вариантах осуществления, человек.

[00100] Используемый в данном документе термин «терапевтическое средство» относится к любому средству, которое можно использовать для лечения, контролирования или облегчения симптомов, связанных с заболеванием или расстройством, где заболевание или расстройство связано с функцией, которая должна обеспечиваться трансгеном. Используемый в данном документе термин «терапевтически эффективное количество» относится к количеству средства (*например*, количеству продукта, экспрессируемого трансгеном), которое обеспечивает по меньшей мере одно терапевтическое преимущество при лечении или контролировании целевого заболевания или расстройства при введении субъекту, страдающему от него. Кроме того, терапевтически эффективное количество средства по изобретению означает такое количество средства отдельно или в сочетании с другими видами терапии, которое обеспечивает по меньшей мере одно терапевтическое преимущество при лечении или контролировании заболевания или расстройства.

[00101] Используемый в данном документе термин «профилактическое средство» относится к любому средству, которое можно использовать для предотвращения, задержки или замедления прогрессирования заболевания или расстройства, когда заболевание или расстройство связано с функцией, которая должна обеспечиваться трансгеном. Используемый в данном документе термин «профилактически эффективное количество» относится к количеству профилактического средства (*например*, количеству продукта, экспрессируемого трансгеном), которое обеспечивает по меньшей мере одно профилактическое преимущество в виде предотвращения или задержки целевого заболевания или расстройства при введении субъекту, предрасположенному к нему. Профилактически эффективное количество также может относиться к количеству средства, достаточному для предотвращения или задержки возникновения целевого заболевания или расстройства; или замедлению прогрессирования целевого заболевания или расстройства;

количеству, достаточному для задержки или минимизации начала целевого заболевания или расстройства; или количеству, достаточному для предотвращения или задержки его повторения или распространения. Профилактически эффективное количество также может относиться к количеству средства, достаточному для предотвращения или задержки обострения симптомов целевого заболевания или расстройства. Кроме того, профилактически эффективное количество в отношении профилактического средства по изобретению означает такое количество профилактического средства отдельно или в сочетании с другими средствами, которое обеспечивает по меньшей мере одно профилактическое преимущество в виде предотвращения или задержки заболевания или расстройства.

[00102] Профилактическое средство по изобретению можно вводить субъекту, «предрасположенному» к целевому заболеванию или расстройству. Субъект, который «предрасположен» к заболеванию или расстройству, представляет собой субъект, у которого проявляются симптомы, связанные с развитием заболевания или расстройства, или который имеет генетическую структуру, воздействие окружающей среды или другой фактор риска для такого заболевания или расстройства, но когда симптомы еще не на том уровне, чтобы диагностировать заболевание или расстройство. Например, пациент с семейным анамнезом заболевания, связанного с отсутствующим геном (должен обеспечиваться трансгеном), может квалифицироваться как предрасположенный к нему. Кроме того, пациента со «спящей» опухолью, которая сохраняется после удаления первичной опухоли, можно квалифицировать как пациента, предрасположенного к рецидиву опухоли.

[00103] Используемый в данном документе термин «центральная нервная система» («ЦНС») относится к нервной ткани, достигаемой циркулирующим средством после пересечения гематоэнцефалического барьера, 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.

5.2. Рекомбинантные капсиды и векторы AAV

[00104] В данном документе предложены рекомбинантные аденоассоциированные вирусы (гAAV), имеющие капсидные белки, сконструированные по сравнению с эталонным капсидным белком, так что гAAV обладает улучшенными желаемыми свойствами, такими как повышенное нацеливание на ткани, включая трансдукцию, геномную интеграцию и экспрессию трансгена, в частности, предпочтительно, относительно эталонного капсидного

белка (например, несконструированного капсида или капсида дикого типа), на ЦНС или на сердечную ткань и/или ткань скелетных мышц. В вариантах осуществления сконструированный капсид обладает пониженным тропизмом (т. е. нацеливанием на ткани, трансдукцией и геномной интеграцией гAAV) по сравнению с эталонным капсидом в отношении печени, ганглий дорсальных корешков и/или периферической нервной ткани для снижения токсичности генной терапии AAV. Модификации включают аминокислотные замены (в том числе 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 аминокислотных замен) и/или пептидные вставки (от 4 до 20, или 7 смежных аминокислот, а в вариантах осуществления не более 12 смежных аминокислот из гетерологичного белка), как описано в настоящем документе.

5.2.1 Сконструированные капсиды с аминокислотными заменами

[00105] В некоторых вариантах осуществления капсиды AAV модифицировали путем введения выбранных от одиночных до множественных аминокислотных замен, которые увеличивают эффективную доставку генов в ЦНС или в сердечную или скелетную мышцу, не воздействуют на печень и/или ганглии дорсальных корешков для снижения токсичности, и/или понижают иммунные ответы нейтрализующих антител.

[00106] В конкретных вариантах осуществления капсиды имеют одну или несколько аминокислотных замен, включая замену W503R, замену Q474, замену N272A или N266A в AAV9, или соответствующую замену в AAV другого серотипа, или замену A269S в AAV8, или соответствующую замену в AAV другого серотипа. гAAV, имеющий капсид с заменой Q474A, может быть особенно полезен для доставки в скелетную и/или сердечную мышцу или ткань ЦНС, а гAAV, имеющий капсид с заменой W503R, может быть особенно полезен для доставки в ткань ЦНС, особенно со сниженной по сравнению с эталонным капсидом, содержащим гAAV, трансдукцией в печени и/или DRG. Другие замены включают замены S263G/S269R/A273T в AAV9 или A587D/Q588G в AAV9, или соответствующие замены в AAV других серотипов. В некоторых вариантах осуществления капсид гAAV может иметь замену R697W. Капсиды, имеющие эти аминокислотные замены и вставки, могут дополнительно иметь замены NNN (аспарагины) в положениях 496-498 на AAA (аланины) в капсиде AAV9 или NNN (аспарагины) в положениях 498-500 на AAA (аланины) в капсиде AAV8, соответствующие заменам в капсидах других типов AAV. Другие серотипы AAV, которые можно использовать для аминокислотных замен и которые могут быть эталонным капсидом, включают AAV8, AAV rh.34, AAV4, AAV5, AAV hu.26, AAV rh.31, AAV hu.13, AAV hu.26, AAV hu.56, AAV hu.53, AAV7, rh64R1, rh46 или rh73. В конкретных вариантах осуществления для доставки в ЦНС капсид представляет собой rh34, либо

немодифицированный, либо служащий исходным капсидом, подлежащим модификации, как подробно описано в настоящем документе.

[00107] Эффективная доставка генов в ЦНС с помощью внутривенно вводимых векторов rAAV требует преодоления гематоэнцефалического барьера. Недавно сообщалось о ключевых кластерах остатков на капсиде AAVrh.10, которые обеспечивают транспорт через сосуды головного мозга и широкое распространение нейрональной трансдукции у мышей. В частности, аминокислоты N262, G263, T264, S265, G267, S268, T269 и T273, полученные из AAVrh.10, были идентифицированы как ключевые остатки, которые способствуют пересечению ГЭБ (Albright et al, 2018, Mapping the Structural Determinants Required for AAVrh.10 Transport across the Blood-Brain Barrier). Были идентифицированы аминокислотные замены в капсидах, таких как капсиды AAV8 и AAV9, которые способствуют пересечению rAAV гематоэнцефалического барьера, трансдукции, не воздействуют на печень и/или снижению иммунных ответов.

[00108] В некоторых вариантах осуществления предложены капсиды, имеющие одну или несколько аминокислотных замен, которые способствуют трансдукции и/или тропизму к тканям rAAV, имеющего модифицированный капсид. В конкретных вариантах осуществления предложены капсиды, имеющие одиночную мутацию в аминокислоте 269 в капсиде AAV8, заменяющую аланин на серин (A269S) (см. **Таблицы 5a-5c**, в настоящем документе упоминается как AAV8.BBB), и аминокислотные замены в соответствующих положениях в других типах AAV. В некоторых вариантах осуществления предложены капсиды, имеющие множественные замены в аминокислотах 263, 269 и 273 в капсиде AAV9, приводящие к следующим заменам: S263G, S269T и A273T (в настоящем документе упоминаются как AAV9.BBB) или замены, соответствующие этим положениям, в других типах AAV.

[00109] Воздействие капсида AAV может вызвать иммунный ответ нейтрализующих антител. Один из подходов к преодолению этого ответа заключается в картировании AAV-специфичных нейтрализующих эпитопов и рациональном конструировании капсида AAV, способного избежать нейтрализации. Недавно было описано моноклональное антитело, специфичное к интактным капсидам AAV9, с высоким нейтрализующим титром (Giles et al, 2018, Mapping an Adeno-associated Virus 9-Specific Neutralizing Epitope To Develop Next-Generation Gene Delivery Vectors). Эпитоп был картирован на 3-кратной оси симметрии капсида, в частности, на остатках 496-NNN-498 и 588-QAQAQT-592 AAV9 (SEQ ID NO:8). Капсидный мутагенез продемонстрировал, что замена одной аминокислоты в этом эпитопе заметно снижает связывание и нейтрализацию. Кроме того, исследования *in vivo* показали, что мутации в эпитопе придавали мутантным векторам фенотип «не воздействия на

печень», что позволяет предположить, что одни и те же остатки также ответственны за тропизм AAV9. Не воздействие на печень также было связано с заменой аминокислоты 503, заменяющей триптофан на аргинин. Наличие мутации W503R в капсиде AAV9 было связано с низкой avidностью связывания гликанов (Shen *et al*, 2012, Glycan Binding Avidity Determines the Systemic Fate of Adeno-Associated Virus Type 9).

[00110] В некоторых вариантах осуществления предложены капсиды, в которых капсиды AAV8.BBB и AAV9.BBB были дополнительно модифицированы путем замены аспарагина в аминокислотных положениях 498, 499 и 500 в AAV8 (в настоящем документе упоминается как AAV8.BBB.LD) или 496, 497 и 498 в AAV9 (в настоящем документе упоминается как AAV9.BBB.LD) на аланины. В некоторых вариантах осуществления капсид AAVrh10 был модифицирован путем замены трех аспарагинов в аминокислотных положениях 498, 499 и 500 на аланины (AAVrh10.LD) (**Таблицы 5а-5с**).

[00111] В некоторых вариантах осуществления предложены капсиды, содержащие три аспарагина в аминокислотных положениях 496, 497 и 498 в капсиде AAV9, замененных на аланины, а также триптофан в аминокислотном положении 503 в капсиде AAV9 на аргинин, или капсиды с заменами, соответствующими этим положениям, в других типах AAV. В некоторых вариантах осуществления предложены капсиды, содержащие глутамин в аминокислотном положении 474 в капсиде AAV9, замененного на аланин, или капсиды с заменами, соответствующими этому положению, в других типах AAV.

[00112] В некоторых вариантах осуществления капсид представляет собой капсид AAV8.BB.LD (замены A269S, 498-NNN/AAA-500 в аминокислотной последовательности AAV8, SEQ ID NO 66), капсид AAV9.BBB.LD (замены S263G/S269T/A273T, 496-NNN/AAA-498 в аминокислотной последовательности AAV9, SEQ ID NO: 67), капсид AAV9.496-NNN/AAA-498 (SEQ ID NO: 31), капсид AAV9.496-NNN/AAA-498.W503R (SEQ ID NO: 32), капсид AAV9.W503R (SEQ ID NO: 33) или капсид AAV9.Q474A (SEQ ID NO: 34). В других примерах капсид может представлять собой капсид AAV9.N272A.496-NNN-498 (SEQ ID NO:91) или капсид AAV9.G266A.496-NNN-498 (SEQ ID NO: 92).

[00113] В некоторых вариантах осуществления гAAV, описанные в настоящем документе, увеличивают тканеспецифическую (таких как, помимо прочего, ЦНС или скелетной и/или сердечной мышцы) клеточную трансдукцию у субъекта (человека, примата, отличного от человека, или мыши) или в клеточной культуре по сравнению с гAAV, не содержащим аминокислотной замены. В некоторых вариантах осуществления тканеспецифичная клеточная трансдукция увеличена по меньшей мере в 2, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 раз, чем без модификации. Например, в некоторых вариантах осуществления тканеспецифичная клеточная трансдукция увеличена в 50-80 раз по сравнению с

трансдукцией того же типа AAV без модификации. Увеличение трансдукции можно оценить с использованием способов, описанных в примерах настоящего документа и известных в данной области техники.

[00114] В некоторых вариантах осуществления гAAV, описанные в настоящем документе, увеличивают встраивание геномов гAAV в тип клетки или ткани у субъекта (человека, примата, отличного от человека, или мыши) или в клеточной культуре по сравнению с гAAV, не содержащим пептидную вставку. В некоторых вариантах осуществления геномная интеграция увеличена по меньшей мере в 2, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 раз, чем у AAV, имеющего капсид без модификации (т. е. исходный капсид). Например, в некоторых вариантах осуществления геномная интеграция увеличена в 50-80 раз по сравнению с геномной интеграцией того же типа AAV без модификации.

5.2.2 Векторы гAAV с пептидными вставками

[00115] Предложены гAAV, имеющие капсидные белки с одной или более (обычно одной или двумя) пептидными вставками, где пептидная вставка увеличивает эффективную доставку гена в ЦНС или в сердечную или скелетную мышцу и не воздействует на печень и/или ганглии дорсальных корешков для снижения токсичности по сравнению с исходным капсидным белком. В конкретных вариантах осуществления пептиды включают TLAVPFK, TLAAPFK или TILSRSTQTG (или по меньшей мере их 4-, 5-, 6-, 7-аминокислотную часть). Пептиды могут быть вставлены в капсид AAV9, например, после положений 138; 262-273; 452-461; 585-593 в кэпе AAV9, особенно после положений 138, 454 или 588 в AAV9, или соответствующих положений в другом AAV, как подробно описано в настоящем документе. В конкретном варианте осуществления капсид содержит пептид TLAVPFK (SEQ ID NO:20), вставленный между G588 и A589 в AAV9, и, в частности, капсидный белок также имеет аминокислотные замены A587D/Q588G (PHE.eB) и, кроме того, имеет пептид TILSRSTQTG (SEQ ID NO:15), вставленный после положения 138 в AAV9 (в совокупности AAVPHPeB.VP2Herp; см. Таблицу 17), или в соответствующем положении другого AAV. Дополнительные капсиды имеют пептид почки 1 LPVAS, вставленный в капсид, например, между 454 и 455 в AAV9 (см. Таблицу 17), или альтернативно между S268 и S269, или между Q588 и A589 в AAV9, или в соответствующем положении другого серотипа AAV. Такой сконструированный капсид может проявлять преимущественное нацеливание на сердце и скелетную мышцу и пониженное нацеливание (по сравнению с AAV, имеющим немодифицированный капсид) на клетки печени и/или ганглиев дорсальных корешков, и может быть особенно полезен для доставки трансгена, кодирующего терапевтический белок, для лечения заболевания мышц

(например, мышечной дистрофии, но не ограничиваясь этим).

[00116] В некоторых вариантах осуществления пептидная вставка содержит по меньшей мере 4, 5, 6, 7, 8, 9 или все 10 последовательных аминокислот последовательности TILSRSTQTG (SEQ ID NO:15), предпочтительно, которая содержит мотив TQT или STQT (SEQ ID NO :9). В некоторых вариантах осуществления пептидная вставка состоит из по меньшей мере 4, 5, 6, 7, 8, 9 или всех 10 последовательных аминокислот последовательности TILSRSTQTG (SEQ ID NO:15), предпочтительно, которая содержит мотив TQT или STQT (SEQ ID NO :9).

[00117] В некоторых вариантах осуществления пептидная вставка может представлять собой последовательность последовательных аминокислот из домена, нацеленного на ткань почки, или конформационного аналога, предназначенного для имитации трехмерной структуры указанного домена. В некоторых вариантах осуществления домен хоуминга почек содержит последовательность CLPVASC (SEQ ID NO:5) (*см., например, US 5622699*). В некоторых вариантах осуществления пептидная вставка из указанного домена хоуминга почек содержит по меньшей мере 4, 5, 6 или все 7 аминокислот из последовательности CLPVASC (SEQ ID NO:5). В некоторых вариантах осуществления пептидная вставка содержит или состоит из последовательности CLPVASC (SEQ ID NO:5).

[00118] Было обнаружено, что оба цистеиновых остатка в некоторых пептидах хоуминга могут быть удалены без существенного влияния на активность пептида в отношении хоуминга органа. Например, пептид, имеющий последовательность LPVAS (SEQ ID NO:6), также может представлять собой пептид хоуминга почек. Способы определения необходимости наличия цистеинового остатка или аминокислотных остатков, N-концевых или C-концевых по отношению к цистеиновому остатку для активности пептида в отношении хоуминга органа, являются обычными и хорошо известны в данной области техники. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления пептидная вставка содержит по меньшей мере 4 или все 5 аминокислот из последовательности LPVAS (SEQ ID NO:6). В некоторых вариантах осуществления пептидная вставка содержит или состоит из последовательности LPVAS (SEQ ID NO:6).

[00119] В конкретных вариантах осуществления предложены гAAV, имеющие капсид, содержащий пептид TLAAPFK (SEQ ID NO:1), вставленный между Q588 и A589 в AAV9 (AAV9.hDyn; *см. Таблицу 17*) или в соответствующем положении другого AAV (*см. Фиг. 7*). Такой сконструированный капсид может проявлять преимущественное нацеливание на ткань ЦНС и пониженное нацеливание (по сравнению с AAV, имеющим немодифицированный капсид) на клетки печени и/или ганглиев дорсальных корешков и/или ткань периферической нервной системы, и может быть особенно полезен для

доставки трансгена, кодирующего терапевтический белок, для лечения заболевания ЦНС.

[00120] Предложены капсиды с пептидными вставками в положениях, допускающих пептидные вставки в и вблизи петли VR-IV капсида AAV9 (см. **Фиг. 2**), и соответствующие области на петле VR-IV капсидов других типов AAV. Хотя в предыдущих исследованиях анализировали потенциальные положения в различных AAV, ни одно из них не определило, что VR-IV AAV9 подходит для этой цели (рассмотрите, *например*, 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):515525-; 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; и Ponnazhagan, *et al.* 2001, *J. of Virology* 75(19):9493-9501).

[00121] Соответственно, предложены векторы гAAV, несущие пептидные вставки в этих точках, в частности, в расположенных на поверхности переменных областях в оболочке капсида, в частности, в 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 C-конце) аминокислотного остатка, соответствующего одной из аминокислот 451-461 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 и Таблицу 17 для других последовательностей капсида), где указанная пептидная вставка расположена на поверхности, когда капсидный белок упакован в виде частицы AAV. Пептидная вставка не должна удалять какие-либо остатки капсидного белка AAV. Как правило, пептидная вставка происходит в переменной (слабо консервативной) области капсидного белка по сравнению с другими серотипами и в расположенной на поверхности петле.

[00122] Пептидная вставка, описанная как вставка «в» заданный сайт, относится к вставке сразу после, то есть имеет пептидную связь с карбоксильной группой, остатка, обычно

обнаруживаемого в этом сайте в вирусе дикого типа. Например, вставка в Q588 в AAV9 означает, что пептидная вставка появляется 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 внутри структурной петли, которая является сайтом вставки).

[00123] В конкретных вариантах осуществления капсидный белок представляет собой капсидный белок AAV9, и вставка происходит сразу после по меньшей мере одного из аминокислотных остатков 451-461. В конкретных вариантах осуществления пептидная вставка происходит сразу после аминокислоты I451, N452, G453, S454, G455, Q456, N457, Q458, Q459, T460 или L461 в капсиде AAV9 (аминокислотная последовательность SEQ ID NO:67). В некоторых вариантах осуществления пептид встроен между остатками S454 и G455 капсидного белка AAV9 или между остатками, соответствующими S454 и G455 капсидного белка AAV, отличного от капсидного белка AAV9 (аминокислотная последовательность SEQ ID NO:67).

[00124] В других вариантах осуществления предложены сконструированные капсидные белки, содержащие нацеливающие пептиды, гетерологичные капсидному белку, которые встроены в капсидный белок AAV таким образом, что при включении в вектор AAV гетерологичный пептид расположен на поверхности.

[00125] 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 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 rh74 (AAVrh74, версий 1 и 2), серотипа rh34 (AAVrh34), серотипа hu26 (AAVhu26), серотипа rh31 (AAVrh31), серотипа hu56 (AAVhu56), серотипа hu53 (AAVhu53), серотипа rh64R1 (AAVrh64R1), серотипа rh46 (AAVrh46) и серотипа rh73 (AAVrh73) (см. **Фиг. 7** или **Таблицу 17**), и вставка происходит сразу после аминокислотного остатка, соответствующего по меньшей мере одному из аминокислотных остатков 451-461. Выравнивания этих различных серотипов AAV, как показано на **Фиг. 7**, указывает «соответствующие» аминокислотные остатки в различных аминокислотных последовательностях капсида, так что «соответствующий» аминокислотный остаток выстраивается в том же положении при выравнивании, что и остаток в эталонной последовательности. В некоторых конкретных вариантах осуществления пептидная вставка происходит 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); 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 AAVhu.37 (SEQ ID NO:71); 452-461 AAVrh74 (SEQ ID NO:72 или SEQ ID NO:80) или 452-461 AAVrh39 (SEQ ID NO:73), в последовательностях, показанных на **Фиг. 7**. В некоторых вариантах осуществления капсидный белок rAAV содержит пептидную вставку сразу после (*т. е.* на С-конце) аминокислоты 588 капсидного белка AAV9 (имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67 и см. **Фиг. 7**), где указанная пептидная вставка расположена на поверхности, когда капсидный белок упакован в виде частицы AAV. В других вариантах осуществления капсидный белок rAAV имеет пептидную вставку, которая не находится сразу после аминокислоты 588 в AAV9 и не соответствует аминокислоте 588 в AAV9.

[00126] В конкретных вариантах осуществления пептид вставлен 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); 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 AAVrh74 (SEQ ID NO:72 or SEQ ID NO:80) , 138; 263-274; 452-461; 587-595 капсида AAVhu37 (SEQ ID NO:71) или 138; 263-274; 452-461; 587-595 капсида AAVrh39 (SEQ ID NO:73) (как пронумеровано на **Фиг. 7**).

[00127] 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 практически 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 вариантах осуществления пептид имеет длину не более 7 аминокислот, 10 аминокислот или 12 аминокислот.

[00128] «Пептидная вставка 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 белка человека в капсидном белке AAV.

[00129] В некоторых вариантах осуществления гAAV, описанные в настоящем документе, увеличивают тканеспецифическую (таких как, помимо прочего, ЦНС или скелетной и/или сердечной мышцы) клеточную трансдукцию у субъекта (человека, примата, отличного от человека, или мыши) или в клеточной культуре по сравнению с гAAV, не содержащим аминокислотной замены. В некоторых вариантах осуществления тканеспецифичная клеточная трансдукция увеличена по меньшей мере в 2, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 раз, чем без пептидной вставки. Например, в некоторых вариантах осуществления тканеспецифичная клеточная трансдукция увеличена в 50-80 раз по сравнению с трансдукцией того же типа AAV без модификации. Увеличение трансдукции можно оценить с использованием способов, описанных в примерах настоящего документа и известных в данной области техники.

[00130] В некоторых вариантах осуществления гAAV, описанные в настоящем документе, увеличивают встраивание геномов гAAV в тип клетки или ткани, в частности в ЦНС или сердце, и/или скелетную мышцу, у субъекта (человека, примата, отличного от человека, или мыши) или в клеточной культуре по сравнению с гAAV, не содержащим пептидную вставку. В некоторых вариантах осуществления геномная интеграция увеличена по меньшей мере в 2, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 раз, чем у AAV, имеющего капсид без пептидной вставки. Например, в некоторых вариантах осуществления геномная интеграция увеличена в 50-80 раз по сравнению с геномной интеграцией того же типа AAV без пептидной вставки.

[00131] В другом аспекте предложены библиотеки капсидов, включая библиотеки гетерологичных пептидных вставок или библиотеки капсидов, имеющие одну или несколько аминокислотных замен. Библиотека вставок гетерологичных пептидов относится к набору векторов гAAV, которые несут вставку одного и того же пептида в

разных местах вставки в вирусном капсиде, *например*, в разных положениях в пределах данной вариабельной области капсида или в разных вариантах пептидов, или даже в одной или нескольких аминокислотных заменах. Предложены способы скрининга гAAV, имеющих капсиды из библиотеки повышения улучшенных свойств, таких как тропизм к тканям, включая усиленную трансдукцию в ЦНС или ткани сердечной и/или скелетной мышцы и, в том числе, сниженную трансдукцию в клетках печени и/или DRG. Как правило, используемые капсидные белки содержат геномы AAV, которые содержат модифицированные последовательности гер и сар для предотвращения репликации вируса в условиях, в которых он мог бы нормально реплицироваться (коинфекция клетки млекопитающего вместе с хэлперным вирусом, таким как аденовирус). Члены библиотек пептидных вставок затем могут быть проанализированы на функциональную экспозицию пептида на поверхности гAAV, нацеливание на ткани и/или генную трансдукцию.

5.2.3 Дополнительные сайты вставки капсида AAV

[00132] Ниже приведены сайты вставки описанных в данном документе пептидов 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).

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).

AAVrh74: 138; 263-274; 452-461; 587-595 и в конкретном варианте осуществления между 454-455 (SEQ ID NO:72 или SEQ ID NO:80).

AAVhu.37: 138; 263-274; 452-461; 587-595 и в конкретном варианте осуществления между 454-455 (SEQ ID NO:71).

[00133] В конкретных вариантах осуществления пептидная вставка происходит между аминокислотными остатками 588-589 в капсиде AAV9 или между соответствующими остатками в капсиде другого типа AAV, что определяется выравниванием аминокислотной последовательности (например, как на **Фиг. 7**). В конкретных вариантах осуществления пептидная вставка происходит сразу после аминокислотных остатков I451-L461, S268 и Q588 капсидной последовательности AAV9 или сразу после соответствующих остатков капсидной последовательности другого AAV (**Фиг. 7**).

[00134] В некоторых вариантах осуществления в одной системе можно использовать одну или несколько пептидных вставок. В некоторых вариантах осуществления капсид выбирают и/или дополнительно модифицируют для снижения распознавания частиц AAV иммунной системой субъекта, например, для предотвращения ранее существовавших антител у субъекта. В некоторых вариантах осуществления. В некоторых вариантах осуществления капсид выбирают и/или дополнительно модифицируют для усиления желаемого тропизма/нацеливания.

5.2.4 Векторы AAV

[00135] Также предложены векторы AAV, содержащие сконструированные капсиды. В некоторых вариантах осуществления векторы AAV являются нереплицирующимися и не содержат нуклеотидных последовательностей, кодирующих белки гер или сар (они поставляются упаковывающими клетками при производстве векторов гAAV). В некоторых вариантах осуществления векторы на основе AAV содержат компоненты одного или нескольких серотипов AAV. В некоторых вариантах осуществления векторы на основе AAV, представленные в настоящем документе, содержат капсидные компоненты одного или нескольких из AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9,

AAV10, AAV11, AAV12, AAV13, AAV14, AAV15, AAV16, AAV.rh8, AAV.rh10, AAV.rh20, AAV.rh39, AAV.Rh74, AAV.RHM4-1, 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, AAV.HSC16, AAVrh34, AAVhu26, AAVrh31, AAVhu56, AAVhu53, AAVrh64R1, AAVrh46 и AAVrh73, или других частиц rAAV, или комбинации двух или более из них. В некоторых вариантах осуществления векторы на основе AAV, представленные в настоящем документе, содержат компоненты одного или нескольких из AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV13, AAV14, AAV15, AAV16, AAV.rh8, AAV.rh10, AAV.rh20, AAV.rh39, AAV.Rh74, AAV.RHM4-1, 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, AAV.HSC16, AAVrh34, AAVhu26, AAVrh31, AAVhu56, AAVhu53, AAVrh64R1, AAVrh46 и AAVrh73, или других частиц rAAV, или комбинации двух или более их серотипов. В некоторых вариантах осуществления частицы rAAV содержат капсидный белок, идентичный по меньшей мере на 80% или более, *например*, на 85%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, и т.д., т.е. до 100% идентичный, *например*, последовательности VP1, VP2 и/или VP3 капсида AAV серотипа, выбранного из AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV13, AAV14, AAV15, AAV16, AAV.rh8, AAV.rh10, AAV.rh20, AAV.rh39, AAV.Rh74, AAV.RHM4-1, AAV.hu37, AAV.Anc80, rAAV.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, AAVrh34, AAVhu26, AAVrh31, AAVhu56, AAVhu53, AAVrh64R1, AAVrh46, и AAVrh73, или их производных, модификаций или псевдотипов. Эти сконструированные векторы AAV могут содержать геном, содержащий трансген, кодирующий терапевтический белок.

[00136] В конкретных вариантах осуществления рекомбинантный AAV для применения в композициях и способах по настоящему изобретению представляет собой Anc80 или Anc80L65 (см., *например*, Zinn *et al.*, 2015, *Cell Rep.* 12(6): 1056-1068, содержание которой полностью включено посредством ссылки). В конкретных вариантах осуществления

рекомбинантный AAV для применения в композициях и способах по настоящему изобретению представляет собой AAV.7m8 (включая его варианты) (см., *например*, US 9193956; US 9458517; US 9587282; US 2016/0376323 и WO 2018/075798, содержание каждого из которых полностью включено в настоящий документ посредством ссылки). В конкретных вариантах осуществления AAV для применения в композициях и способах по настоящему изобретению представляет собой любой AAV, описанный в US 9585971, 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 *su5*, *rh20* или *rh39* (см., *например*, Issa *et al.*, 2013, PLoS One 8(4): e60361, содержание которой включено в настоящий 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 настоящий документ посредством ссылки: US 7282199; US 7906111; US 8524446; US 8999678; US 8628966; US 8927514; US 8734809; US 9284357; US 9409953; US 9169299; US 9193956; US 9458517; US 9587282; US 2015/0374803; US 2015/0126588; US 2017/0067908; US 2013/0224836; US 2016/0215024; US 2017/0051257; PCT/US2015/034799 и PCT/EP2015/053335. В некоторых вариантах осуществления частицы гAAV имеют капсидный белок, идентичный по меньшей мере на 80 % или более, *например*, на 85 %, 85 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% и т. д., т.е. до 100% идентичный, последовательности VP1, VP2 и/или VP3 капсида AAV, описанного в любом из следующих патентов и патентных заявок, содержание каждого из которых полностью включено в настоящий документ посредством ссылки: патенты США № 7282199; 7906111; 8524446; 8999678; 8628966; 8927514; 8734809; US 9284357; 9409953; 9169299; 9193956; 9458517 и 9587282; 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.

[00137] В некоторых вариантах осуществления частицы гAAV содержат любой капсид AAV, описанный в патенте США № 9840719 и WO 2015/013313, такой как AAV.Rh74 и RHM4-1, содержание каждого из которых полностью включено в настоящий документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления частицы гAAV содержат любой капсид AAV, описанный в WO 2014/172669, такой как AAV *rh.74*, содержание которой полностью включено в настоящий документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления частицы гAAV содержат капсид AAV2/5, как описано в

Georgiadis *et al.*, 2016, *Gene Therapy* 23: 857-862 и Georgiadis *et al.*, 2018, *Gene Therapy* 25: 450, содержание каждого из которых полностью включено посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления частицы гAAV содержат любой капсид AAV, описанный в WO 2017/070491, такой как AAV2tYF, содержание которой полностью включено в настоящий документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления частицы гAAV содержат капсиды AAVLK03 или AAV3B, как описано в Puzzo *et al.*, 2017, *Sci. Transl. Med.* 29(9): 418, содержание которого полностью включено посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления частицы гAAV содержат любой капсид AAV, описанный в патентах США № 8628966; US 8927514; US 9923120 и WO 2016/049230, такие как HSC1, HSC2, HSC3, HSC4, HSC5, HSC6, HSC7, HSC8, HSC9, HSC10, HSC11, HSC12, HSC13, HSC14, HSC15 или HSC16, содержание каждого из которых полностью включено посредством ссылки.

[00138] В некоторых вариантах осуществления частицы гAAV содержат капсидный белок, описанный в Публикациях междунар. заявок № 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 Публикации заявки США № 20150023924 (см., *например*, SEQ ID NO: 1, 5-10 из публикации '924), содержание каждого из которых полностью включено в настоящее описание посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления частицы гAAV имеют капсидный белок, идентичный по меньшей мере на 80 % или более, *например*, на 85 %, 85 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% и т. д., т.е. до 100% идентичный, последовательности VP1, VP2 и/или VP3 капсида AAV, описанной в Публикациях междунар. заявок № 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 Публикации заявки США № 20150023924 (см., *например*, SEQ ID NO: 1, 5-10 из публикации '924).

[00139] 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 использования 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) и Auricchio *et al.*, *Hum. Molec. Genet.* 10:3075-3081, (2001).

[00140] В некоторых вариантах осуществления можно использовать одноцепочечный AAV (оцAAV). В некоторых вариантах осуществления можно использовать самокомплементарный вектор, например, scAAV (см., например, Wu, 2007, *Human Gene Therapy*, 18(2):171-82; McCarty *et al.*, 2001, *Gene Therapy*, 8(16):1248-1254; US 6596535; US 7125717 и US 7456683, содержание каждого из которых полностью включено в настоящий документ посредством ссылки).

5.3. Способы получения частиц гAAV

[00141] Другой аспект настоящего изобретения включает получение частиц гAAV, имеющих описанные в данном документе капсиды. В некоторых вариантах осуществления частицу гAAV получают путем обеспечения нуклеотида, содержащего последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую любой из описанных в данном документе капсидных белков; и использования системы упаковывающих клеток для получения соответствующих частиц гAAV с капсидными оболочками, состоящими из капсидного белка. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты кодирует последовательность, которая по меньшей мере на 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 99,9% идентична последовательности молекулы капсидного белка, описанной в настоящем документе, и сохраняет (или по существу сохраняет) биологическую функцию капсидного белка. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота кодирует последовательность, которая по меньшей мере на 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 99,9% идентична последовательности одного из капсидных белков, описанных в настоящем документе, например, последовательностям, приведенными в Таблице 17, или иным образом описанными в настоящем документе (см. также **Фиг. 7**), при сохранении (или при сохранении по существу) биологической функции капсидного белка.

[00142] 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 ген сар и/или ген гер для экспрессии и сплайсинга гена сар. В других вариантах осуществления гены сар и гер обеспечиваются упаковывающей клеткой и не присутствуют в вирусном геноме.

[00143] В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая сконструированный капсидный белок, клонируется в хелперную плазмиду Rep-Cap AAV вместо существующего капсидного гена. При совместном введении в клетки-хозяева эта плазида помогает упаковать геном гAAV в сконструированный капсидный белок в качестве капсидной оболочки. 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.

[00144] Стандартные методы могут быть использованы для рекомбинантной ДНК, синтеза олигонуклеотидов, культуры и трансформации тканей (*например*, электропорация, липофекция). Методики ферментативных реакций и очистки можно проводить в соответствии с указаниями производителя или так, как это обычно делается в данной области техники, или как описано в данном документе. Вышеупомянутые методики и процедуры могут, как правило, выполняться в соответствии с обычными способами, хорошо известными в данной области техники, и как описано в различных общих и более конкретных справочных материалах, которые цитируются и обсуждаются в данном описании. См., например, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)), содержание которого включено в данный документ посредством ссылки для любой цели. Если не предоставлены конкретные определения, номенклатура, используемая в связи с описанными в данном документе лабораторными процедурами и методами аналитической химии, синтетической органической химии, медицинской и фармацевтической химии, является хорошо известной и широко используемой в данной области техники. Стандартные методы могут быть использованы для химического синтеза, химического анализа, приготовления, составления и доставки фармацевтического препарата, а также для лечения пациентов. Последовательности нуклеиновых кислот вирусных векторов на основе AAV и способы получения рекомбинантных AAV и капсидов AAV описаны, *например*, в US 7282199; US 7790449; US 8318480; US 8962332 и PCT/EP2014/076466, содержание каждого из которых полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

[00145] В некоторых вариантах осуществления гAAV обеспечивают векторы доставки трансгена, которые можно использовать в терапевтических и профилактических целях, как

более подробно обсуждается ниже. В некоторых вариантах осуществления вектор гAAV также включает регуляторные элементы контроля, известные специалисту в данной области техники, которые влияют на экспрессию РНК и/или белковых продуктов, кодируемых нуклеиновыми кислотами (трангенами), в клетках-мишенях субъекта. Регуляторные элементы контроля могут быть и тканеспецифичными, то есть активными (или по существу более активными, или значительно более активными) только в клетке-мишени/ткани. 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 (ЦМВ), промотор вируса саркомы Рауса (RSV), промотор MMT, промотор EF-1 альфа, промотор UB6, промотор куриного бета-актина, промотор CAG, промотор RPE65, промотор опсина, промотор TBG (тироксин-связывающего глобулина), промотор APOA2, промотор SERPINA1 (hAAT) или промотор MIR122. В некоторых вариантах осуществления, особенно когда может быть желательно отключить экспрессию трансгена, используют индуцируемый промотор, *например*, индуцируемый гипоксией или рапамицин-индуцируемый промотор.

[00146] В конкретных вариантах осуществления предложены векторы AAV, содержащие вирусный геном, содержащий кассету экспрессии для экспрессии трансгена, находящуюся под контролем регуляторных элементов, фланкированную ITR, и сконструированный вирусный капсид, как описано в настоящем документе, или который по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 99,9% идентичный аминокислотной последовательности капсидного белка, описанного в настоящем документе (см., *например*, **Таблицу 17**), при сохранении биологической функции сконструированного капсида. В некоторых вариантах осуществления кодируемый сконструированный капсид имеет последовательность капсида AAV8.BBB.LD (SEQ ID NO: 27), капсида AAV9.BBB.LD (SEQ ID NO: 29), капсида AAV9.496-NNN/AAA-498 (SEQ ID NO: 31), капсида AAV9.496-NNN/AAA-498 (SEQ ID NO: 32), капсида AAV9.W503R (SEQ ID NO: 33), капсида AAV9.Q474A (SEQ ID NO: 34), капсида AAV9.N272A.496-NNN/AAA-498 (SEQ ID NO: 91) или капсида AAV9.N266A.496-NNN/AAA-498 (SEQ ID NO: 92). Также предложены сконструированные векторы AAV, отличные от векторов AAV9, такие как сконструированные векторы AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV9e, AAVrh10, AAVrh20, AAVhu.37, AAVrh39, AAVrh74, AAVrh34, AAVhu26, AAVrh31, AAVhu56, AAVhu53, AAVrh.46, AAVrh.64.R1, AAV.rh.73, в том числе с аминокислотными заменами и/или пептидной вставкой, как описано в настоящем документе, и 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 последовательности дикого типа или несконструированной последовательности для этого типа AAV, которая сохраняет свою биологическую функцию.

[00147] Рекомбинантный аденовирус может быть вектором первого поколения с делецией E1, с делецией E3 или без нее, и с кассетой экспрессии, 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 концевые повторы аденовируса и сигнал упаковки (пси, англ.: psi). Трансген обычно вставляют между сигналом упаковки и 3'ITR, с последовательностями-вкладышами или без них, чтобы сохранить размер генома близким к размеру дикого типа, составляющему приблизительно 36 т.п.н. Типовой протокол получения аденовирусных векторов можно найти в Alba *et al.*, 2005, "Gutless adenovirus: last generation adenovirus for gene therapy," *Gene Therapy* 12:S18-S27, содержание которого полностью включено в настоящий документ посредством ссылки

[00148] Вектор rAAV для доставки трансгена к тканям-, клеткам- или органам-мишеням обладает тропностью к этой конкретной ткани-, клетке- или органу-мишени. Также могут быть использованы тканеспецифические промоторы. Конструкция дополнительно может включать элементы контроля экспрессии, которые усиливают экспрессию трансгена, управляемого вектором (*например*, интронами, такими как интрон куриного β -актина, интрон мелкого вируса мышей (MVM), интрон человеческого фактора IX (*например*, укороченный интрон I FIX), интрон донора сплайсинга β -глобина/ акцептора сплайсинга тяжелой цепи иммуноглобулина, интрон донора сплайсинга аденовируса/ акцептора сплайсинга иммуноглобулина, интрон донора позднего сплайсинга SV40/ акцептора сплайсинга (19S/16S) и интрон донора сплайсинга гибридного аденовируса/ акцептора сплайсинга IgG, и сигналами полиА, такими как сигнал полиА β -глобина кролика, сигнал полиА гормона роста человека (hGH), поздний сигнал полиА SV40, искусственный сигнал полиА (SPA) и сигнал полиА бычьего гормона роста (bGH). *См., например*, Powell and Rivera-Soto, 2015, *Discov. Med.*, 19(102):49-57.

[00149] В некоторых вариантах осуществления последовательности нуклеиновых кислот, описанные в настоящем документе, могут быть оптимизированы по кодонам, например, с помощью любого метода оптимизации кодонов, известного специалисту в данной области техники (*см., например*, обзор Quax *et al.*, 2015, *Mol Cell* 59:149-161).

[00150] В конкретном варианте осуществления конструкции, описанные в настоящем документе, содержат следующие компоненты: (1) инвертированные концевые повторы

AAV2, которые фланкируют каскету экспрессии; (2) контрольные элементы, которые включают а) промотор и, необязательно, энхансерные элементы для стимуляции экспрессии трансгена в ЦНС и/или мышечных клетках, б) необязательно последовательность интрона, такую как интрон куриного β -актина, и с) последовательность полиаденилирования, такую как сигнал поли-А SV40 или сигнал поли-А β -глобина кролика; и (3) трансген, обеспечивающий (*например*, кодирующий) интересующую нуклеиновую кислоту или белковый продукт.

[00151] Представленные в настоящем документе вирусные векторы могут быть получены с использованием клеток-хозяев, *например*, клеток-хозяев млекопитающих, включая клетки-хозяева человека, обезьян, мышей, крыс, кроликов или хомячков. Неограничивающие примеры включают: A549, WENI, 10T1/2, BHK, MDCK, COS1, COS7, BSC 1, BSC 40, BMT 10, VERO, W138, HeLa, 293, Saos, C2C12, L, HT1080, HepG2, первичные фибробласты, гепатоциты и миобласты. Как правило, клетки-хозяева стабильно трансформируются последовательностями, кодирующими трансген и ассоциированные элементы (*т.е.* векторный геном), и генетическими компонентами для продуцирования вирусов в клетках-хозяевах, такими как гены репликации и гены капсида (*например*, гены *rep* и *cap* AAV). Способ получения рекомбинантных векторов AAV с капсидами AAV8 описаны в разделе IV Подробного описания патента США № 7282199 В2, содержание которого полностью включено в настоящий документ посредством ссылки. Титры геномных копий указанных векторов можно определить, например, с помощью анализа TAQMAN®. Вирионы могут быть выделены, например, путем осаждения CsCl₂. Альтернативно, бакуловирусные системы экспрессии в клетках насекомых могут быть использованы для получения векторов AAV. Для обзора см. Aponte-Ubillus *et al.*, 2018, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102:1045-1054, содержание которого полностью включено в настоящее описание посредством ссылки для технологий производства.

[00152] Анализы *in vitro*, *например* анализы клеточных культур, можно использовать для измерения экспрессии трансгена из вектора, описанного в настоящем документе, что указывает, *например*, на активность вектора. Например, для оценки экспрессии трансгена можно использовать клеточную линию PER.C6® (Lonza), клеточную линию, полученную из эмбриональных клеток сетчатки человека, или клетки пигментного эпителия сетчатки, *например*, клеточную линию пигментного эпителия сетчатки hTERT RPE-1 (доступную от ATCC®). В качестве альтернативы можно использовать клеточные линии, полученные из печени или других типов клеток, например, клетки NuH-7, HEK293, клетки фибросаркомы HT-1080, НКВ-11 и CAP, но не ограничиваясь ими. После экспрессии можно определить характеристики экспрессированного продукта (*т.е.* трансгенного продукта), включая

определение паттернов гликозилирования и сульфатирования тирозина, с использованием анализов, известных в данной области техники.

5.4. Терапевтическое и профилактическое применение

[00153] Другой аспект относится к терапии, которая включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, трансгена посредством вектора гAAV по изобретению для задержки, предотвращения, лечения и/или сдерживания заболевания или расстройства и/или облегчения одного или нескольких связанных с ними симптомов. Субъект, нуждающийся в этом, включает субъекта, страдающего от заболевания или расстройства, или субъекта, предрасположенного к этому, *например*, субъекта с риском развития или рецидива заболевания или расстройства. Как правило, гAAV, несущий конкретный трансген, найдет применение в отношении данного заболевания или расстройства у субъекта, у которого его нативный ген, соответствующий трансгену, дефектен в обеспечении правильного продукта гена или правильного количества продукта гена. Затем трансген может обеспечить копию гена, дефектного у субъекта.

[00154] Как правило, трансген содержит 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 геномного конструирования, такого как редактирование генома посредством гомологичной рекомбинации. В некоторых вариантах осуществления трансген кодирует терапевтическую РНК, такую как кшРНК, искусственная микроРНК или элемент, влияющий на сплайсинг.

[00155] В приведенных ниже **Таблицах 1А-1В** представлен список трансгенов, которые можно использовать в любом из векторов гAAV, описанных в настоящем документе, в частности, в новых сайтах вставки, описанных в настоящем документе, для лечения или профилактики заболеваний, с которыми связан трансген, которые также перечислены в **Таблицах 1А-1В**. Как описано в настоящем документе, вектор AAV может быть сконструирован, как описано в настоящем документе, для нацеливания на соответствующую ткань для доставки трансгена для осуществления терапевтического или профилактического применения. Подходящий серотип AAV может быть выбран для конструирования с целью оптимизации тропизма к ткани и трансдукции вектора.

Таблица 1А

Заболевание	Трансген	Возможный серотип AAV для доставки трансгена
MPS I	альфа-L-идуронидаза (IDUA)	AAV9
MPS II (синдром Хантера)	идуронат-2-сульфатаза (IDS)	AAV9
цериодный липофусциноз (болезнь Баттена)	(CLN1, CLN2, CLN10, CLN13), растворимый лизосомальный белок (CLN5), белок секреторного пути (CLN11), два цитоплазматических белка, которые также периферически связаны с мембранами (CLN4, CLN14), и многие трансмембранные белки с различной субклеточной локализацией (CLN3, CLN6, CLN7, CLN8, CLN12)	AAV9
MPS IIIa (синдром Санфилиппо типа A)	гепарансульфатсульфатаза (также называемая N-сульфоглюкозаминсульфогидролазой (SGSH))	AAV9, Rh10
MPS IIIb (синдром Санфилиппо типа B)	N-ацетил-альфа-D-глюкозаминидаза (NAGLU)	AAV9
MPS VI (синдром Маро-Лами)	арилсульфатаза B	AAV8
Синдром Моркио (MPS IV)	Бета-галактозидаза или галактозамин-6-сульфатаза	AAV9
Болезнь Гоше (тип I, II и III)	Глюкоцереброзидаза, GBA1	AAV9
Болезнь Паркинсона	Глюкоцереброзидаза; GBA1	AAV9
Болезнь Паркинсона	дофаминдекарбоксилаза	AAV2

Заболевание	Трансген	Возможный серотип AAV для доставки трансгена
Болезнь Помпе	кислая мальтаза; GAA	AAV9
Метахроматическая лейкодистрофия	Арилсульфатаза А	Rh10
MPS VII (синдром Слая)	бета-глюкуронидаза	
MPS VIII	глюкозамин-6-сульфатсульфатаза	
MPS IX	гиалуронидаза	
Болезнь Ниманна-Пика	сфингомиелиназа	
Болезнь Ниманна-Пика без дефицита сфингомиелиназы	ген prp1, кодирующий фермент, метаболизирующий холестерин	
Болезнь Тея-Сакса	Альфа-субъединица бета-гексозаминидазы	
болезнь Сандхоффа	как альфа-, так и бета-субъединица бета-гексозаминидазы	
Болезнь Фабри	альфа-галактозидаза	
Фукозидоз	Фукозидаза (ген FUCA1)	
Альфа-маннозидоз	альфа-маннозидаза	

Заболевание	Трансген	Возможный серотип AAV для доставки трансгена
Бета-маннозидоз	Бета-маннозидаза	
Болезнь Вольмана	гидролаза сложного эфира холестерина	
Болезнь Паркинсона	Нейротурин	
Болезнь Паркинсона	глиальный фактор роста (GDGF)	
Болезнь Паркинсона	тирозингидроксилаза	
Болезнь Паркинсона	декарбоксилаза глутаминовой кислоты.	
Болезнь не указана	фактор роста фибробластов-2 (FGF-2)	
Болезнь не указана	фактор роста головного мозга (BDGF)	
Болезнь не указана (Галактосиалидоз (синдром Гольдберга))	дефицит нейраминидазы с дефицитом бетагалактозидазы	
Спинальная мышечная атрофия (SMA)	SMN	AAV9
атаксия Фридрейха	Фратаксин	AAV9 PHP.B
Боковой амиотрофический склероз (БАС)	SOD1	Rh10
Болезнь накопления	Глюкозо-6-фосфатаза	AAV8

Заболевание	Трансген	Возможный серотип AAV для доставки трансгена
гликогена 1a		
XLMTM	MTM1	AAV8 или AAV9
Синдром Криглера-Наджара	UGT1A1	AAV8
CPVT	CASQ2	AAV9
синдром Ретта	MECP2	AAV9
Ахроматопсия	CNGB3, CNGA3, GNAT2, PDE6C	AAV8
Хоридермия	CDM	AAV8
Болезнь Данона	LAMP2	AAV9

Таблица 1В

Заболевание	Трансген	Возможный серотип AAV для доставки трансгена
Муковисцидоз (кистозный фиброз)	CFTR	AAV2
Мышечная дистрофия Дюшенна	Ген мини-дистрофина или микро-дистрофина	AAV2, AAV8 или AAV9
Поясно-мышечная дистрофия конечностей типа 2С Гамма-саркогликанопатия	альфа-саркогликан человека	AAV1
Прогрессирующая сердечная недостаточность	SERCA2a	AAV6
Ревматоидный артрит	Слитый ген TNFR:Fc	AAV2
Врожденный амавроз Лебера	GAA	AAV1
Поясно-мышечная дистрофия конечностей типа 2С Гамма-	гамма-саркогликан	AAV1

Заболевание	Трансген	Возможный серотип AAV для доставки трансгена
саркогликанопатия		
Пигментный ретинит	hMERTK	AAV2
Возрастная дегенерация желтого пятна	sFLT01	AAV2
Мышечная дистрофия Беккера и спорадический миозит с включениями	huFollistatin344	AAV1
Болезнь Паркинсона	GDNF	AAV2
Метахроматическая лейкодистрофия (MLD)	cuARSA	AAVrh.10
Гепатит С	кшPHK против HCV	AAV8
Поясно-мышечная дистрофия конечностей типа 2D	hSGCA	AAVrh74*
инфекции вируса иммунодефицита человека; ВИЧ-инфекции (ВИЧ-1)	PG9DP	AAV1
Острая интермиттирующая порфирия	PBGD	AAV5
Наследственная оптическая нейропатия Лебера	P1ND4v2	AAV2
Дефицит альфа-1-антитрипсина	alpha1AT	AAVrh10
Болезнь Помпе	hGAA	AAV9
Ретиношизис, сцепленный с X-хромосомой	RS1	AAV8
Хориодеремия	hCHM	AAV2
Гигантская аксональная невропатия	JeT-GAN	AAV9
Мышечная дистрофия Дюшенна	микро-дистрофин	AAVrh74*
Ретиношизис, сцепленный с X-	hRS1	AAV2

Заболевание	Трансген	Возможный серотип AAV для доставки трансгена
хромосомой		
Плоскоклеточный рак головы и шеи; Радиационно-индуцированная ксеростомия	hAQP1	AAV2
Гемофилия В	Фактор IX	AAVrh10/ Rh74
Гомозиготная FH	hLDLR	AAV8
Дисферлинопатии	rAAVrh74.MHCK7.DYSF.DV	AAVrh74
Гемофилия В	Нуклеаза ZFP AAV6	AAV6
MPS I	Нуклеаза ZFP AAV6	AAV6
Ревматоидный артрит	NF-kB.IFN- β	AAV5
Болезнь Баттена / CLN6	CLN6	AAV9
Болезнь Санфилиппо типа А	hSGSH	AAV9
Остеоартрит	5IL-1Ra	AAV2.5
Ахроматопсия	CNGA3	AAV2tYF
Ахроматопсия	CNGB3	AAV8
Дефицит орнитинтранскарбамилазы (ОТС)	ОТС	scAAV8
Гемофилия А	Фактор VIII	LK03/AAV3B
Мукополисахаридоз II	Нуклеаза ZFP	AAV6
Гемофилия А	Нуклеаза ZFP	AAV6
Влажная форма AMD	анти-VEGF	AAV8
Пигментный ретинит, сцепленный с X-хромосомой	PGR	AAV2
Мукополисахаридоз типа VI	hARSB	AAV8
Наследственная оптическая нейропатия Лебера	ND4	AAV2
Миотубулярная миопатия, сцепленная с X-хромосомой	MTM1	AAV8

Заболевание	Трансген	Возможный серотип AAV для доставки трансгена
Синдром Криглера-Наджара	UGT1A1	AAV8
Ахроматопсия	CNGB3	AAV8
Пигментный ретинит	hPDE6B	AAV5
Пигментный ретинит, сцепленный с X-хромосомой	RPGR	AAV2tYF
Мукополисахаридоз типа 3 В	hNAGLU	AAV9
Мышечная дистрофия Дюшенна	GALGT2	AAVrh74
Артрит, ревматоидный; Артрит, псориатический; Анкилозирующий спондилоартрит	Слитый ген TNFR:Fc	AAV2
Идиопатическая болезнь Паркинсона	Нейротурин	AAV2
Болезнь Альцгеймера	NGF	AAV2
инфекции вируса иммунодефицита человека; ВИЧ-инфекции (ВИЧ-1)	tgAAC09	AAV2
Семейный дефицит липопротеинлипазы	LPL	AAV1
Идиопатическая болезнь Паркинсона	Нейротурин	AAV2
Дефицит альфа-1-антитрипсина	hAAT	AAV1
Врожденный амавроз Лебера (LCA) 2	hRPE65v2	AAV2
Болезнь Баттена; Поздний инфантильный нейрональный липофусциноз	CLN2	AAVrh.10
Болезнь Паркинсона	GAD	AAV2
Болезнь Санфилиппо типа А/	Ген N-	AAVrh.10

Заболевание	Трансген	Возможный серотип AAV для доставки трансгена
Мукополисахаридоз типа IIIA	сульфоглюкозаминсульфогидролазы (SGSH)	
Хроническая сердечная недостаточность	SERC2a	AAV1
Мышечная дистрофия Беккера и спорадический миозит с включениями	rAAV1.CMV.huFollistatin344	AAV1
Болезнь Паркинсона	hAADC-2	AAV2
Хориодермия	REP1	AAV2
СЕА-специфическое лечение AAV-DC-CTL при раке желудка IV стадии	CEA	AAV2
Рак желудка	MUC1-пептид-DC-CTL	
Наследственная оптическая нейропатия Лебера	scAAV2-P1ND4v2	scAAV2
Дефицит декарбоксилазы ароматических аминокислот	hAADC	AAV2
Гемофилия В	Фактор IX	AAVrh10
Болезнь Паркинсона	AADC	AAV2
Наследственная оптическая нейропатия Лебера	Генетический: GS010 Препарат: Плацебо	AAV2
SMA - Спинальная мышечная атрофия Генная терапия	SMN	AAV9
Гемофилия А	Фактор VIII с удаленным В-доменом	AAV8
MPS I	IDUA	AAV9
MPS II	IDS	AAV9
CLN3-связанный нейрональный цероид-липофусциноз (болезнь Баттена)	CLN3	AAV9

Заболевание	Трансген	Возможный серотип AAV для доставки трансгена
Поясно-мышечная дистрофия конечностей типа 2E	hSGCB	rh74
Болезнь Альцгеймера	APOE2	rh10
Пигментный ретинит	hMERKTK	AAV2
Пигментный ретинит	RLBP1	AAV8
Влажная форма AMD	Антитело к VEGF	AAV2.7m8

[00156] Например, вектор гAAV, содержащий трансген, кодирующий глиальный фактор роста (GDGF), находит применение для лечения/профилактики/контроля болезни Паркинсона. Как правило, вектор гAAV вводят системно. Например, вектор гAAV можно вводить внутривенно, интратекально, интраназально и/или внутрибрюшинно.

[00157] В некоторых вариантах осуществления трансген кодирует микродистрофин (например, как описано в WO 2021/108755, WO 2002/029056, WO 2016/115543, WO 2015/197232, WO 2016/177911, US 7892824 B2, US 9624282 B2, и WO 2017221145, содержание которых включено в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме) и применим для лечения дистрофинопатий, таких как мышечная дистрофия. В приведенном в данном документе Примере 18 показано относительное количество капсидов AAV7, AAV8, AAV9, AAVrh.10, AAVrh.46, AAVrh.64.R1 и AAVrh.73 после внутривенного введения мышам дикого типа по сравнению с мышами *mdx* (животная модель мышечной дистрофии). Частицы гAAV, имеющие эти капсиды, или их сконструированные формы могут быть полезны для доставки трансгенов, кодирующих микродистрофины или другие терапевтические белки дистрофинопатии, в мышечные клетки, включая скелетную и/или сердечную мышцу, при сниженной доставке в клетки печени, для лечения мышечных дистрофий, таких как мышечная дистрофия Дюшенна.

[00158] В конкретных аспектах гAAV по настоящему изобретению находят применение для доставки в ткани-мишени или типы клеток-мишеней, включая клеточный матрикс, связанный с типами клеток-мишеней, связанных с расстройством или заболеванием, которое необходимо лечить/предотвратить. Заболевание или расстройство, связанное 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 расстройства проявляются в конкретной ткани или типе клеток. Способы доставки трансгена в ткань-мишень нуждающегося в этом субъекта включают введение субъекту гAAV, где пептидная вставка представляет собой пептид хоуминга. В случае болезни Паркинсона, например, можно использовать вектор гAAV, содержащий пептидную вставку, которая направляет гAAV в нервную ткань, в частности, когда пептидная вставка облегчает проникновение гAAV через гематоэнцефалический барьер в ЦНС.

[00159] Для заболевания или расстройства, связанного с нервной тканью, можно использовать вектор гAAV, который содержит пептидную вставку из домена хоуминга нервной ткани, такого как любой из описанных в настоящем документе. Заболевания/расстройства, связанные с нервной тканью, включают болезнь Альцгеймера, боковой амиотрофический склероз (БАС), болезнь Баттена, ювенильную форму НЦЛ Баттена, болезнь Канавана, хроническую боль, атаксию Фридрейха, мультиформную глиобластому, болезнь Хантингтона, поздний инфантильный нейрональный цероидный липофуциноз (LINCL), лизосомные болезни накопления, врожденный амавроз Лебера, рассеянный склероз, болезнь Паркинсона, болезнь Помпе, синдром Ретта, повреждение спинного мозга, спинальную мышечную атрофию (СМА), инсульт и черепно-мозговую травму. Кроме того, вектор может содержать трансген для терапевтической/профилактической пользы для субъекта, страдающего или подверженного риску развития заболевания или расстройства (см. Таблицы 1A-1B).

[00160] Векторы гAAV по изобретению также могут способствовать доставке, в частности, адресной доставке, олигонуклеотидов, лекарственных средств, визуализирующих средств, неорганических наночастиц, липосом, антител к клеткам- или тканям-мишеням. Векторы гAAV также могут способствовать доставке, в частности, адресной доставке, некодирующей ДНК, РНК или олигонуклеотидов в ткани-мишени.

[00161] Средства могут быть предоставлены в виде фармацевтически приемлемых композиций, известных в данной области техники и/или описанных в данном документе. Также молекулу гAAV по изобретению можно вводить отдельно или в комбинации с другими профилактическими и/или терапевтическими средствами.

[00162] Предусмотренные в данном документе количества доз и частота введения охватываются терминами «терапевтически эффективный» и «профилактически эффективный». Дозировка и частота обычно варьируются в зависимости от факторов, специфичных для каждого пациента, в зависимости от конкретных вводимых терапевтических или профилактических средств, тяжести и типа заболевания, пути введения, а также возраста, массы тела, реакции и прошлой истории болезни пациента, и должны определяться в соответствии с мнением лечащего врача и обстоятельствами

каждого пациента. Подходящие схемы могут быть выбраны специалистом в данной области техники с учетом таких факторов и следования, например, дозировкам, описанным в литературе и рекомендованным в Physician 's Desk Reference (56th ed., 2002). Профилактические и/или терапевтические средства можно вводить повторно. Некоторые аспекты процедуры могут различаться, например временной режим введения профилактических или терапевтических средств, а также то, вводятся ли такие средства отдельно или в виде смеси.

[00163] Количество средства по изобретению, которое будет эффективным, можно определить стандартными клиническими методами. Эффективные дозы могут быть экстраполированы из кривых доза-ответ, полученных в тест-системах *in vitro* или на животных моделях. Для любого средства, используемого в способе по изобретению, терапевтически эффективная доза может быть первоначально оценена в анализах клеточных культур. Доза может быть составлена на животных моделях для достижения диапазона плазменной концентрации в кровотоке, который включает IC_{50} (*m.e.* концентрацию исследуемого соединения, при которой достигается полумаксимальное ингибирование симптомов), определенную в клеточной культуре. Такая информация может быть использована для более точного определения доз, пригодных для человека. Уровни в плазме можно измерить, например, с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии.

[00164] Профилактические и/или терапевтические средства, а также их комбинации можно тестировать в подходящих модельных системах животных перед применением у людей. Такие модельные системы животных включают крыс, мышей, кур, коров, обезьян, свиней, собак, кроликов и *m. d.*, но не ограничиваются ими. Можно использовать любую систему животных, хорошо известную в данной области техники. Такие модельные системы широко используются и хорошо известны специалистам в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления используют модельные системы животных для состояния ЦНС, основанные на крысах, мышах или других мелких млекопитающих, отличных от приматов.

[00165] После того, как профилактические и/или терапевтические средства по изобретению были испытаны на животной модели, они могут быть испытаны в клинических испытаниях для установления их эффективности. Клинические испытания 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 средств по изобретению. Например, клиническое испытание может быть разработано для проверки молекулы гAAV по изобретению на эффективность

и токсичность у пациентов-людей.

[00166] Токсичность и эффективность профилактических и/или терапевтических средств по данному изобретению можно определить стандартными фармацевтическими процедурами на клеточных культурах или экспериментальных животных, *например*, для определения LD₅₀ (доза, летальная для 50% популяции) и ED₅₀ (доза, терапевтически эффективна у 50% популяции). Соотношение доз между токсическим и терапевтическим эффектами является терапевтическим индексом и может быть выражено как отношение LD₅₀/ED₅₀. Предпочтительны профилактические и/или терапевтические средства, которые проявляют большие терапевтические индексы. Хотя могут использоваться профилактические и/или терапевтические средства, которые проявляют токсические побочные эффекты, следует позаботиться о разработке системы доставки, которая нацеливает такие средства на участок пораженной ткани, чтобы свести к минимуму потенциальное повреждение неинфицированных клеток и, таким образом, уменьшить побочные эффекты.

[00167] Молекулу гAAV по изобретению обычно 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 использовать для определения диапазона и/или схемы дозирования профилактических и/или терапевтических средств для применения у людей. Дозировка таких средств находится в диапазоне концентраций в кровотоке, который включает ED₅₀ с небольшой токсичностью или без токсичности. Дозировка может варьироваться в пределах этого диапазона в зависимости от используемой лекарственной формы и используемого пути введения.

[00168] 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 вектора гAAV, или от около 1×10^{10} до около 1×10^{15} , от около 1×10^{12} до около 1×10^{16} , или от около 1×10^{14} до около 1×10^{16} геномов AAV. Уровни экспрессии трансгена можно отслеживать для определения/корректировки дозировки, частоты, режима дозирования и т.п.

[00169] Лечение субъекта терапевтически или профилактически эффективным количеством средств по изобретению может включать однократное лечение или серию курсов лечения. Например, фармацевтические композиции, содержащие средство по изобретению, могут быть введены однократно или могут быть введены сериями из 2, 3 или 4 или более раз, например, еженедельно, ежемесячно или каждые два месяца, 3 месяца, 6 месяцев или один год до введения серии доз.

[00170] Молекулы гAAV по изобретению можно вводить отдельно или в комбинации с другими профилактическими и/или терапевтическими средствами. Каждое профилактическое или терапевтическое средство 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 терапевтическое средство можно вводить отдельно, в любой подходящей форме и любым подходящим способом.

[00171] В различных вариантах осуществления различные профилактические и/или терапевтические средства вводят с интервалом менее 1 часа, около 1 часа, от около 1 часа до около 2 часов, от около 2 часов 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 24 часов или не более 48 часов. В некоторых вариантах осуществления два или более средства вводят в течение одного посещения пациента.

[00172] Способы введения средств по изобретению включают, помимо прочего, парентеральное введение (*например*, внутривенное, внутримышечное, внутрибрюшинное, внутривенное и подкожное, включая инфузию или болюсную инъекцию), эпидуральное введение и введение путем абсорбции через эпителиальные или слизисто-кожные, или слизистые оболочки (*например*, интраназально, через слизистую оболочку рта, слизистую оболочку прямой кишки и кишечника и *т. д.*). В конкретных вариантах осуществления, например, когда трансген, предназначен для экспрессии в ЦНС, вектор вводят посредством люмбальной пункции или через мозжечково-мозговую цистерну.

[00173] В некоторых вариантах осуществления средства по изобретению вводят внутривенно и их можно вводить вместе с другими биологически активными средствами.

[00174] В другом конкретном варианте осуществления средства по изобретению могут быть доставлены в виде состава с замедленным высвобождением, *например*, когда составы обеспечивают пролонгированное высвобождение и, таким образом, увеличенный период полувыведения вводимого средства. Системы с контролируемым высвобождением, подходящие для применения, включают, помимо прочего, системы с контролируемой диффузией, контролируемые растворителем системы и химически контролируемые системы. Системы с регулируемой диффузией включают, например, резервуарные устройства, в которых молекулы по 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 контролируемой диффузией, в которой двойные антигенсвязывающие молекулы диспергированы или растворены в контролирующей скорости матрице (*например*, полимерной матрице). Средства по изобретению могут быть однородно диспергированы в контролирующей скорости матрице, и скорость высвобождения регулируется 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.

[00175] Любая методика, известная специалисту в данной области техники, может быть использована для получения составов с замедленным высвобождением, содержащих один или несколько средств, описанных в настоящем документе. См., *например* патент США № 4526938; 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; и Lam et al., “Microencapsulation of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody for Local Delivery,” *Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater.*, 24:759 760, 1997, содержание каждого из которых полностью включено в данный документ посредством ссылки. В одном варианте осуществления в системе с контролируемым высвобождением может использоваться насос (см. Langer, *supra*; 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 использовать для достижения контролируемого высвобождения средств, 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 № 5679377; патент США № 5916597; патент США № 5912015; патент США № 5989463; патент США № 5128326; публикацию PCT № WO 99/15154 и публикацию PCT № WO 99/20253). В еще одном варианте

осуществления система с контролируемым высвобождением может быть размещена вблизи терапевтической мишени (*например*, пораженного сустава), что требует лишь части системной дозы (см., *например*, Goodson, in *Medical Applications of Controlled Release*, supra, vol. 2, pp. 115 138 (1984)). Другие системы с контролируемым высвобождением обсуждаются в обзоре Langer, *Science*, 249:1527 1533, 1990.

[00176] Кроме того, гAAV можно использовать для доставки трансгенов *in vivo* для научных исследований, таких как оптогенетика, нокдаун генов с помощью микроРНК, доставка рекомбиназы для условной делеции генов, редактирование генов с помощью CRISPR и т.п.

5.5. Фармацевтические композиции и наборы

[00177] В изобретении дополнительно предложена фармацевтическая композиция, содержащая фармацевтически приемлемый носитель и средство по данному изобретению, указанное средство содержит молекулу гAAV по данному 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» означает 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, адьюванту (*например*, полному и неполному адьюванту Фрейнда), эксципиенту или носителю (наполнителю), с которым вводят средство. Такие фармацевтические носители могут представлять собой стерильные жидкости, такие как вода и масла, включая масла нефтяного, животного, растительного или синтетического происхождения, включая, *например*, арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и т.п. Вода является обычным носителем при внутривенном введении фармацевтической композиции. Солевые растворы и водные растворы декстрозы и глицерина также могут использоваться в качестве жидких носителей, особенно для растворов для инъекций. Подходящие фармацевтические эксципиенты включают крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, мел, силикагель, стеарат натрия, моностеарат глицерина, тальк, хлорид натрия, сухое обезжиренное молоко, глицерин, пропиленгликоль, воду, этанол и т.п. Дополнительные примеры фармацевтически приемлемых носителей, эксципиентов 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 ЭДТА; сахарные спирты, такие как маннит или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; и/или неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как TWEENTM, полиэтиленгликоль (ПЭГ) 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. Эти композиции могут находиться в форме растворов, суспензий, эмульсий, таблеток, пилюль, капсул, порошков, составов с замедленным высвобождением и т.п.

[00178] В некоторых вариантах осуществления изобретения предложены фармацевтические композиции для применения в соответствии со способами по изобретению, причем указанные фармацевтические композиции содержат терапевтически и/или профилактически эффективное количество средства по изобретению вместе с фармацевтически приемлемым носителем.

[00179] В некоторых вариантах осуществления средство по изобретению является по существу очищенным (*т.е.* практически не содержит веществ, которые ограничивают его действие или вызывают нежелательные побочные эффекты). В конкретном варианте осуществления хозяин или субъект представляет собой животное, *например*, млекопитающее, например, отличное от приматов (*например*, коровы, свиньи, лошади, кошки, собаки, крысы и т. д.) и такое как приматы (*например*, обезьяны, такие как яванский макак, и человек). В определенном варианте хозяином является человек.

[00180] В изобретении предложены дополнительные наборы, которые можно использовать в вышеуказанных способах. В одном варианте осуществления набор содержит одно или несколько средств по изобретению, *например*, в одном или нескольких контейнерах. В другом варианте осуществления набор дополнительно содержит одно или несколько других профилактических или терапевтических средств, пригодных для лечения состояния, в одном или нескольких контейнерах.

[00181] Изобретение также предлагает средства по изобретению, упакованные в герметично закрытый контейнер, такой как ампула или саше, с указанием количества средства или активного агента. В одном варианте осуществления средство поставляется в виде сухого стерилизованного лиофилизированного порошка или безводного концентрата в герметично закрытом контейнере и может быть восстановлено, *например*, водой или

физиологическим раствором до соответствующей концентрации для введения субъекту. Обычно средство поставляется в виде сухого стерильного лиофилизированного порошка в герметично закрытом контейнере в единичной дозировке 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. Лиофилизированное средство следует хранить при температуре от 2 до 8 °С в оригинальном контейнере, и следует вводить средство 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 средство по изобретению поставляется в жидкой форме в герметично закрытом контейнере с указанием количества и концентрации средства или активного агента. Обычно жидкая форма средства поставляется в герметично закрытом контейнере в концентрации 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.

[00182] Композиции по изобретению включают нерасфасованные композиции лекарственных средств, используемые при производстве фармацевтических композиций (*например*, неочищенные или нестерильные композиции), а также фармацевтические композиции (т.е. композиции, подходящие для введения субъекту или пациенту). Нерасфасованные композиции лекарственных средств можно использовать при приготовлении стандартных лекарственных форм, *например*, содержащих профилактически или терапевтически эффективное количество средства, описанного в настоящем документе, или комбинации этих средств и фармацевтически приемлемого носителя.

[00183] В изобретении дополнительно предложена фармацевтическая упаковка или набор, включающий один или несколько контейнеров, наполненных одним или несколькими средствами по изобретению. Кроме того, в фармацевтическую упаковку или набор также могут быть включены одно или несколько других профилактических или терапевтических средств, пригодных для лечения целевого заболевания или расстройства. В изобретении также предложена фармацевтическая упаковка или набор, включающий один или несколько контейнеров, наполненных одним или несколькими ингредиентами фармацевтических композиций по изобретению. При необходимости, с таким контейнером(ами) может предоставляться уведомление в форме, предписанной государственным органом, регулирующим производство, использование или продажу фармацевтических или биологических продуктов, которое отражает одобрение агентства по производству, использованию или продаже для введения человеку.

[00184] Как правило, ингредиенты композиций по 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 средства или активного агента. Если композицию следует вводить путем инфузии, ее можно вводить во флакон для инфузии, содержащий стерильную воду или физиологический раствор фармацевтической степени чистоты. Если композицию вводят путем инъекции, может быть предоставлена ампула со стерильной водой для инъекций или физиологическим раствором, чтобы можно было смешать ингредиенты перед введением.

6. ПРИМЕРЫ

[00185] В следующих примерах сообщается об анализе расположенных на поверхности петель капсида AAV9 для выявления кандидатов для конструирования капсида посредством инсерционного мутагенеза. Изобретение иллюстрируется примерами, описывающими конструкцию капсидов гAAV9, сконструированных таким образом, чтобы они содержали 7-мерные пептиды, созданные на основе хвоста тяжелой цепи аксонемного динеина человека. Вкратце, использовали три критерия для выбора поверхностных петель, которые могли бы поддаваться коротким пептидным вставкам: 1) минимальное взаимодействие боковых цепей с соседними петлями; 2) вариабельность последовательности и структуры между серотипами (отсутствие консервативных последовательностей); и 3) возможность прерывания эпитопов, обычно нацеленных на нейтрализующие антитела. Была сконструирована панель мутантов со пептидной вставкой, и отдельные мутанты были подвергнуты скринингу в отношении жизнеспособной сборки капсида, расположения пептида на поверхности и активности. Лучших кандидатов затем использовали в качестве матриц для вставки пептидов хоуминга, чтобы проверить, можно ли использовать эти точки пептидных вставок для повторного нацеливания векторов гAAV на представляющие интерес ткани. Дополнительные примеры демонстрируют увеличенную трансдукцию и тропизм к ткани для некоторых модифицированных капсидов AAV, описанных в настоящем документе.

6.1. Пример 1 – Анализ капсида AAV9

[00186] Фиг. 1 и 2 иллюстрируют анализ четвертой вариабельной области аденоассоциированного вируса типа 9 (VR-IV AAV9) путем сравнения аминокислотной последовательности с другими VR-IV AAV (Фиг. 1) и белковой моделью (Фиг. 2). Как видно, VR-IV AAV9 экспонируется на поверхности на вершине или на внешней

поверхности тройного шипа. Дальнейший анализ показал, что существует незначительное взаимодействие боковых цепей между VR-IV и VR-V и что последовательность и структура VR-IV являются переменными среди серотипов AAV, и, кроме того, существует возможность для прерывания эпитопа, обычно нацеленного на нейтрализующие антитела, и таким образом, снижения иммуногенности модифицированного капсида.

6.2. Пример 2 – Конструирование мутантов AAV9

[00187] 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 2**.

Таблица 2

Обозначение векторов	Место вставки метки FLAG в VR-IV AAV9
pRGNX1090	I451
pRGNX1091	N452
pRGNX1092	G453
pRGNX1093	S454
pRGNX1094	G455
pRGNX1095	Q456
pRGNX1096	N457
pRGNX1097	Q458

6.3. Пример 3 – Анализ эффективности упаковки

[00188] На **Фиг. 3** показана высокая эффективность упаковки с точки зрения количества геномных копий на мл (ГК/мл) AAV9 дикого типа и восьми (8) векторов-кандидатов gAAV9 (1090, 1091, 1092, 1093, 1094, 1095, 1096 и 1097), где векторы-кандидаты содержат вставку FLAG в разных сайтах VR-IV AAV9. Все векторы упаковывали 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.

[00189] Как видно, все кандидаты обладают высокой эффективностью упаковки.

6.4. Пример 4 – Анализ расположения FLAG на поверхности

[00190] На **Фиг. 4** показано расположение на поверхности вставок FLAG в каждом из

восьми (8) векторов-кандидатов гAAV9 (1090, 1091, 1092, 1093, 1094, 1095, 1096 и 1097), подтвержденное иммунопреципитацией трансдуцированных векторов путем связывания с анти-FLAG смолой. Связывание с анти-FLAG указывает на точки вставки, которые позволяют формировать капсиды, которые отображают пептидную вставку на поверхности. [00191] Трансдуцированные клетки лизировали и центрифугировали. 500 мкл супернатанта клеточной культуры наносили на 20 мкл гранул агароза-FLAG и элюировали загрузочным буфером ДСН-ПААГ, который также загружали непосредственно на гель. В качестве отрицательного контроля использовали супернатант 293-ssc, который не содержал вставок FLAG.

[00192] Как видно, 1090 имел самый низкий титр среди векторов-кандидатов, что указывает на наименьшее количество извлеченного белка. Очень низкие титры также наблюдались в положительном контроле. Вполне вероятно, что было загружено недостаточное количество положительного контроля для визуализации в ДСН-ПААГ.

6.5. Пример 5 – Анализ эффективности трансдукции

[00193] На Фиг. 5А-5В показана 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. 5А), или в относительных световых единицах (RLU, англ.: Relative Light Unit) на микрограмм белка (Фиг. 5В).

[00194] Клетки Lec2, полученные из СНО, выращивали в α MEM и 10% ФБС. Клетки Lec2 трансдуцировали при MOI около 2×10^8 ГК вектора (MOI около 10000) и обрабатывали реагентом ViraDuctin (аналогичные результаты наблюдали при трансдукции клеток Lec2 при MOI около 10000 ГК/клетку, но обработанных 40 мкг/мл хлорида цинка ($ZnCl_2$); результаты не показаны). Клетки Lec2 являются ауксотрофами по пролину, происходящими из СНО.

[00195] Как видно, эффективность трансдукции *in vitro* ниже, чем при использовании AAV9 дикого типа (9-luc). Тем не менее, предыдущие исследования показали, что введение пептида хоуминга 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

пептида для вставки

[00196] На **Фиг. 6А** показана гистограмма, иллюстрирующая, что вставки пептида различной длины и состава непосредственно после S454 в капсиде AAV9 (SEQ ID NO:67) могут влиять на эффективность продукции частиц AAV в упаковывающей клеточной линии. Десять пептидов разного состава и длины были вставлены после S454 (между остатками 454 и 455) в VR-IV AAV9. кПЦР проводили на собранном супернатанте трансфицированной суспензии 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 X в скобках).

[00197] Исследовали векторы AAV9, имеющие капсидный белок, содержащий пептид хоуминга следующих пептидных последовательностей (**Таблица 3**) 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 Polyplus) при соотношении ДНК:PEI 1:1,75. Клетки центрифугировали и супернатант собирали через пять дней после трансфекции и хранили при -80°C .

Таблица 3.

№ пептида	Ткань или обозначение мишени	Пептидная последовательность	SEQ ID NO:
P1	Кость1 (D8)	DDDDDDDD	2
P2	Мозг 1	LSSRLDA	3
P3	Мозг 2	CLSSRLDAC	4
P4	Почка 1	LPVAS	6
P5	Почка 2	CLPVASC	5
P6	Мышца 1	ASSLNIA	7
P7	TfR1	HAIYPRH	10
P8	TfR2	THRPPMWSPVWP	11
P9	TfR3	RTIGPSV	12
P10	TfR4	CRTIGPSVC	13

[00198] кПЦР проводили на собранном супернатанте трансфицированной суспензии клеток НЕК293 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 кПЦР с использованием TaqMan Universal PCR Master Mix, No AmpEraseUNG (ThermoFisherScientific) и праймера/зонда против последовательности полиА, упакованной в трансгенную конструкцию. Стандартные кривые были построены с использованием вектора BDS RGX-501.

[00199] Пептидные вставки непосредственно после S454 длиной от 5 до 10 аминокислот продуцируют частицы AAV, имеющие адекватный титр, хотя возможен верхний предел размера, при этом для пептидной вставки, имеющей длину 12 аминокислот, наблюдаются значительные недостатки упаковки.

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

[00200] На **Фиг. 6В-Е** представлены флуоресцентные изображения клеточных культур (**Фиг. 6В**) клеточной линии Lec2 (эпителиальная клеточная линия, дефицитная по сиаловой кислоте), (**Фиг. 6С**) клеточной линии НТ-22 (нейронная клеточная линия), (**Фиг. 6D**) клеточной линии hСМЕС/D3 (эндотелиальная клеточная линия головного мозга) и (**Фиг. 6Е**) клеточной линии С2С12 (мышечная клеточная линия). Капсиды AAV9 дикого типа и со вставкой пептида хоуминга в S454 из **Таблицы 3**, содержащие трансген GFP, использовали для трансдукции указанных клеточных линий.

[00201] Клеточные линии высевали в количестве $5-20 \times 10^3$ клеток/лунку (в зависимости от клеточной линии) в 96-луночные 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 уровне экспрессии в каждой клеточной линии. Клетки Lec2 культивировали, как в Примере 5, клетки гематоэнцефалического барьера hСМЕС/D3 (EMD Millipore) культивировали в соответствии с протоколом производителя, клетки НТ-22 и НУН7 культивировали в DMEM и 10% ФБС, а миобласты С2С12 высевали в среду DMEM и 10% ФБС, и дифференцировали в течение трех дней до трансфекции в среде DMEM с добавлением 2% лошадиной сыворотки и 0,1% инсулина. AAV9.S454.FLAG показал низкие уровни трансдукции в каждом исследуемом типе клеток.

[00202] Изображения показывают, что пептиды хоуминга 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 показывает самый высокий уровень трансдукции, за которым следует P9 (пептид TfR3, RTIGPSV (SEQ ID NO:12)). P4 (пептид почки 1, LPVAS (SEQ ID NO:6)) показал немного более высокий уровень трансдукции, чем у AAV9 дикого типа для всех типов клеток. Более высокие уровни трансдукции наблюдались для P6 (пептид мышцы 1, ASSLNIA (SEQ ID NO:7)) в культурах эндотелиальных клеточных линий головного мозга hCMEC/D3 и мышечных клеточных линий C2C12 по сравнению с культурами клеточных линий Lec2 и HT-22. Вектор P1 не был показан на изображениях из-за чрезвычайно низкой эффективности трансдукции, а вектор P8 не был показан из-за низкого титра.

6.8. Пример 8 – Анализ капсидов AAV в отношении точек пептидных вставок

[00203] На Фиг. 7 показано выравнивание капсидных последовательностей AAV 1-9e, rh10, rh20, rh39, rh74, hu12, hu21, hu26, hu37, hu51 и hu53 с сайтами вставок пептидов человека в пределах или рядом с кодоном инициации VP2, вариабельной областью 1 (VR-I), вариабельной областью 4 (VR-IV) и вариабельной областью 8 (VR-VIII), выделенными серым цветом; конкретный сайт вставки в восьмой вариабельной области (VR-VIII) каждого капсидного белка показан символом «#» (после аминокислотного остатка 588 в соответствии с нумерацией аминокислот в AAV9).

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

[00204] На Фиг. 8 показаны 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 17).

[00205] 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 со вставкой TLAVPFK (SEQ ID NO:20) в капсиде AAV9 с двумя аминокислотными модификациями капсидной последовательности выше вставки PHP.B (см. также Таблицу 17). В Таблице 4А обобщены капсиды, использованные в исследовании.

Таблица 4А

Название	Исходный 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 H	AAV9	-	588_589	QAVRTS H	17

Материалы и методы

[00206] Конструкции AAV9, AAV.PHPeB, AAV.hDyn, AAV.PHP.S и AAV.PHP.SH, кодирующие трансген GFP, были приготовлены и составлены в 1xФБС + 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 4В** ниже. Дозируемый объем составлял 10 мл/кг (0,200 мл/20 г мыши). Мыши были в возрасте 8-12 недель на дату начала. На 15-й день после введения животных подвергали эвтаназии и собирали периферические ткани, включая ткань мозга, печени, бицепсов передних конечностей, сердца, почек, легких, яичников и седалищного нерва.

Таблица 4В

Гр.	№	Средство	Доза состава	Способ введения	Схема
1	9	AAV9	2,5E12 ГК/кг	в/в	День 1
2	5	PHPeB	2,5E12 ГК/кг	в/в	День 1
3	5	hDyn	2,5E12 ГК/кг	в/в	День 1
4	5	PHP.S	2,5E12 ГК/кг	в/в	День 1
5	5	PHP.SH	2,5E12 ГК/кг	в/в	День 1

[00207] Количественную ПЦР (кПЦР) использовали для определения количества векторных геномов на мкг геномной ДНК головного мозга. Образцы мозга от инъецированных мышей обрабатывали и выделяли геномную ДНК с использованием набора Blood and Tissue Genomic DNA от Qiagen. Анализ кПЦР проводили на приборе

QuantStudio 5 (Life Technologies Inc) с использованием комбинации праймер-зонд, специфичной для eGFP, по методу стандартной кривой.

[00208] Количество копий геномного вектора AAV на мкг геномной ДНК головного мозга было по меньшей мере на логарифм (log) выше у мышей, которым вводили AAV.hDyп, по сравнению со всеми другими серотипами AAV: AAV9, AAV.PHPeB, PHP.S и PHP.SH (см. **Фиг. 8**). Как видно из этого исследования, количество ГК/мкг геномной ДНК является самым высоким для AAV.hDyп, который представляет собой капсид AAV9, содержащий пептидную вставку «TLAAPFK» (SEQ ID NO:1) (пептид из аксонемного динеина человека) между остатками 588–589 в капсиде AAV9. Исследование продемонстрировало трансдукцию в головном мозге мышей при количестве трансгена более чем 1Е04 ГК/мкг в среднем у 5 мышей, которым системно вводили AAV.hDyп, несущий eGFP. Однако другие модифицированные капсиды AAV9, включая вектор AAV.PHPeB, который содержит последовательность «TLAVPFK» (SEQ ID NO:20) (пептид мышинового динеина), продемонстрировали трансдукцию в головном мозге мышей при количестве трансгена менее чем 1Е03 ГК/мкг при системном лечении.

6.10. Пример 10 – Конструирование капсида rAAV, содержащего TLAAPFK (SEQ ID NO: 2)

[00209] На **Фиг. 9А** показана аминокислотная последовательность капсида рекомбинантного вектора AAV9, включающая пептидную вставку аминокислотной последовательности TLAAPFK (SEQ ID NO:1) между Q588 и A589 в VR-IIIIV. Пептидная вставка выделена жирным шрифтом.

[00210] На **Фиг. 9В** показана аминокислотная последовательность капсида рекомбинантного вектора AAV9, включающая пептидную вставку аминокислотной последовательности TLAAPFK (SEQ ID NO:1) между S268 и S269 в VR-III. Пептидная вставка выделена жирным шрифтом.

[00211] На **Фиг. 9С** показана аминокислотная последовательность капсида рекомбинантного вектора AAV9, включающая пептидную вставку аминокислотной последовательности TLAAPFK (SEQ ID NO:1) между S454 и G455 в VR-IV. Пептидная вставка выделена жирным шрифтом.

6.11. Пример 11: Оценка модифицированных капсидов *in vitro* и *in vivo*

[00212] Капсидные последовательности AAV модифицировали либо пептидными вставками, либо управляемым мутагенезом и объединяли для получения библиотеки со штрих-кодами, упакованной с кассетой экспрессии GFP. Затем модифицированные

векторы оценивали в анализе *in vitro*, а также в отношении биораспределения *in vivo* у мышей с использованием секвенирования следующего поколения (NGS: англ.: next generation sequencing) и количественной ПЦР. AAV.hDyn идентифицировали как вектор с высокой трансдукцией в головном мозге из этого пула и дополнительно оценивали в индивидуальных исследованиях доставки на мышах, чтобы охарактеризовать его профиль трансдукции. Кроме того, был проведен иммуногистохимический анализ срезов головного мозга, чтобы понять клеточный тропизм этого вектора.

6.11.1 Пример 11А – *In vitro* исследование трансдукции через гематоэнцефалический барьер

[00213] Способность модифицированных капсидов преодолевать гематоэнцефалический барьер исследовали в анализе Transwell *in vitro* с использованием клеток ГЭБ hCMEC/D3 (SCC066, Millipore-Sigma) (см. **Фиг. 10А-10В**). 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 клеток hCMEC/D3/см² высевали в покрытые коллагеном вкладыши Transwell в 12-луночном планшете. Каждый вкладыш содержал 500 мкл среды, а нижняя камера содержала 1 мл среды. Среду меняли через 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 ГК вектора в среду верхнего вкладыша 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 кПЦР в отношении ПолиА в трех повторностях.

[00214] На **Фиг. 10А-10В** показан анализ Transwell *in vitro* AAV.hDyn (AAV9 с TLAAPFK (SEQ ID NO: 1) между аминокислотными остатками 588-589), пересекающего слой клеток гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) (**Фиг. 10А**), и результаты, показывающие, что AAV.hDyn (обозначен перевернутыми треугольниками на **Фиг.**) пересекает слой клеток ГЭБ в исследовании быстрее, чем AAV9 (квадраты), а также быстрее и в большей степени, чем AAV2 (кружки) (**Фиг. 10В**). Разработанный анализ *in vitro* спрогнозировал усиленное пересечение ГЭБ, и аналогичные анализы можно использовать для прогнозирования нацеливания на другие органы.

6.11.2 Пример 11В – Трансдукция и биораспределение модифицированных

капсидов

6.11.2.1 Материалы и методы

[00215] Модификации капсида были выполнены на широко используемых капсидах AAV, включая AAV8, AAV9 и AAVrh.10, путем вставки различных пептидных последовательностей после положения S454 в VR-IV (Таблицы 5a-5c) или после положения Q588 в расположенной на поверхности петли VR-VIII капсида AAV, а также вставок после кодона инициации 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. также Таблицу 17 для некоторых капсидных последовательностей). Выбранные аминокислотные мутации от одиночных до множественных также использовали для модификации капсидов. См. также, Yost *et al.*, Structure-guided engineering of surface exposed loops on AAV Capsids. 2019. ASGCT Annual Meeting; and Wu *et al.*, 2000 *J. Virology (supra)*. Было подтверждено, что никакая из этих модификаций капсида в небольших масштабах не оказала негативного влияния на эффективность упаковки.

[00216] rAAV с некоторыми модифицированными капсидами исследовали в отношении трансдукции *in vitro* в клетках Lec2, как описано выше в Примере 5. Модифицированные AAV исследовали в отношении трансдукции в следующих 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 5B ниже для идентификации капсидов AAV.

[00217] Для исследования биораспределения модифицированные AAV были упакованы с кассетой трансгена eGFP, содержащей специфические штрих-коды, соответствующие каждому отдельному капсиду. Новые векторы со штрих-кодом были объединены и введены мышам для повышения эффективности скрининга.

[00218] Для анализа биораспределения генетически измененных векторов AAV были приготовлены различные векторы, кодирующие GFP, и составлены в 1xФБС + 0,0001% плюроновой кислоты. Все векторы были изготовлены с цис-плазмидами, содержащими штрих-код из десяти (10) п.н., чтобы обеспечить возможность подготовки библиотеки (пула) для секвенирования следующего поколения (NGS). Три (3) пула векторов (векторы Исследования 1, Исследования 2 и Исследования 3) вводили внутривенно группе из 5 самок мышей C57Bl/6 в соответствии с Таблицами 5A-C. Дозируемый объем составлял 10 мл/кг (0,2 мл/20 г мыши) для каждой.

[00219] Мыши были рандомизированы в группы лечения в зависимости от массы тела в день 1, и их возраст на дату начала составлял 8-12 недель. На 15-й день после введения животных подвергали эвтаназии и собирали периферические ткани, включая ткань мозга, почек, печени, седалищного нерва, легких, сердца и мышечную ткань. В исследованиях, в которых выбранные капсиды из пула вводили отдельно, следовали одному и тому же протоколу.

[00220] Геномную ДНК (гДНК) выделяли из образцов тканей с использованием набора DNeasy Blood and Tissue (69506) от Qiagen. Область штрих-кода каждого вектора амплифицировали с помощью праймеров, содержащих перекрытия для NGS и стратегий уникальных двойных индексов (UDI; англ.: unique dual indexing) и мультиплексного секвенирования в соответствии с рекомендациями производителя (Illumina). Illumina MiSeq с использованием наборов реагентов nano и micro v2 (MS-103-1001/1002) применяли для определения относительного содержания каждого вектора AAV со штрих-кодом в образце, взятом у мышей. Соответственно, каждый образец вектора в **Таблицах 5А-С** ниже был со штрих-кодом, как указано выше, чтобы обеспечить идентификацию и сортировку каждого считывания перед окончательным анализом данных. Данные были нормализованы на основе состава AAV в первоначально инъецированном пуле и количественно оценены с использованием общего количества геномных копий, полученного из анализа кПЦР с комбинацией праймер-зонд, специфичной для образца со штрих-кодом.

Таблица 5А

Исследование 1	Название	Капсид	Точка вставки	Пептид	Примечания
BC01	AAV9	AAV9	-	-	Синий столбец, Фиг. 21
BC02	RHP.eB	RHP.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

Исследование 1	Название	Капсид	Точка вставки	Пептид	Примечания
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)	Оранжевый столбец, Фиг. 21
BC10	PHP.S	PHP.S	588_589	QAVRTSL (SEQ ID NO:16)	-
BC11	PHP.SH	PHP.SH	588_589	QAVRTSH (SEQ ID NO:17)	-
BC13	rh39	rh.39	-	-	-

Таблица 5В

Исследование 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)

Исследование 2	Название	Капсид	Точка вставки	Пептид	Примечания
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) 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)	

Исследование 2	Название	Капсид	Точка вставки	Пептид	Примечания
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 5С

Исследование 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 (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-Мозг1	AAV9	454_455	LSSRLDA (SEQ ID NO:3)	
BC23	AAV9 S454-Мозг1С	AAV9	454_455	CLSSRLDAC (SEQ ID NO:4)	
BC24	AAV9 S454-Почки1	AAV9	454_455	LPVAS (SEQ ID NO:6)	
BC25	AAV9 S454-Почки1С	AAV9	454_455	CLPVASC (SEQ ID NO:5)	
BC26	AAV9 S454-	AAV9	454_455	ASSLNIA	

Исследование 3	Название	Капсид	Точка вставки	Пептид	Примечания
	Мышца1			(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 (без BC)	PHP.eB	588_589	TLAVPFK (SEQ ID NO:20)	

[00221] В исследованиях, в которых выбранные капсиды из пула вводили отдельно, для определения количества векторных геномов на мкг тканевой геномной ДНК использовали кПЦР. КПЦР проводили на QuantStudio 5 (Life Technologies, Inc.) с использованием комбинации праймер-зонд, специфичной для eGFP, по методу стандартной кривой (Фиг. 12).

[00222] В ходе исследования, в котором отдельные векторы вводили мышам для определения характеристик, делали срезы фиксированного формалином мозга мыши толщиной 40 мкм на микротоме с вибрирующим лезвием (VT1000S, Leica), и зондировали плавающие срезы антителами к GFP, чтобы посмотреть на клеточное распределение доставленных векторов.

[00223] Более конкретно, делали срезы фиксированного мозга мышей, которым вводили AAV.hDyn, с использованием Vibratome (Leica, VT-1000) и оценивали экспрессию GFP с использованием антитела к GFP (AB3080, Millipore Sigma), набора Vectatain ABC (PK-6100, Vector Labs) и набор пероксидазы DAB (SK-4100, Vector Labs). У мышей, которым вводили AAV.hDyn, наблюдалось широкое распределение клеток, экспрессирующих GFP, по всему мозгу, включая распределение в коре, стриатуме и гиппокампе головного мозга. На Фиг. 13А-13С показаны изображения из этих областей, а масштабная линейка равна 400 мкм

(обсуждается ниже).

6.11.2.2 Полученные результаты

[00224] Полученные результаты показаны на **Фиг. 11**, **Фиг. 12А-12Н** и **Фиг. 13А-13С**.

[00225] Данные исследования трансдукции клеток Lec2 не показаны. AAV9 588 Нер (AAV9 с пептидом TILSRSTQTG (SEQ ID NO:15), 5 вставленным после положения 588) проявлял значительно большую трансдукцию (в 4 раза), чем AAV9 дикого типа, а AAV9 VP2 Ad (AAV9 с пептидом SITLVKSTQTV (SEQ ID NO:14), вставленным после положения 138), AAV9 VP2 Нер (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 положения 138) проявляли несколько большую трансдукцию клеток Lec2 по сравнению с AAV9. Другие проанализированные AAV проявляли более низкие уровни трансдукции, чем AAV9.

[00226] На **Фиг. 11** показаны результаты анализа гДНК головного мозга с помощью секвенирования следующего поколения (NGS), показывающего относительное содержание (процентный состав) пула капсидов, доставленных в мозг мышей после внутривенной инъекции. Данные были нормализованы на основе состава AAV в первоначально инъецированном пуле и количественно оценены с использованием общего количества геномных копий, полученного из анализа кПЦР с комбинацией праймер-зонд, специфичной для последовательности eGFP. Показанные данные взяты из трех разных экспериментов. Пунктирные линии указывают, какие векторы были объединены вместе. Исходный AAV9 использовали в качестве стандарта и включали в каждый пул. Идентификаторы «BC» указаны в таблицах 5А, 5В и 5С выше.

[00227] На **Фиг. 12А-12Н** показан профиль трансдукции *in vivo* AAV.hDyп у самок мышей C57Bl/6, показывающий количество копий/микрограмм гДНК у наивных мышей или мышей, которым вводили AAV9 или AAV.hDyп в головной мозг (**Фиг. 12А**), печень (**Фиг. 12В**), сердце (**Фиг. 12С**), легкое (**Фиг. 12D**), почку (**Фиг. 12Е**), скелетную мышцу (**Фиг. 12F**), седалищный нерв (**Фиг. 12G**) и яичник (**Фиг. 12Н**), где AAV.hDyп показывает повышенное биораспределение в головном мозге по сравнению с AAV9. Количество копий геномного вектора AAV на мкг геномной ДНК головного мозга было по меньшей мере на логарифм (log) выше у мышей, которым вводили AAV.hDyп, по сравнению исходным вектором AAV9

[00228] На **Фиг. 13А-13С** показаны изображения областей, проанализированных в иммуногистохимическом анализе, описанном выше; масштабная линейка равна 400 мкм. На **Фиг. 13А-13С** показано распределение GFP из AAV.hDyп по всему мозгу, где

изображения иммуногистохимического окрашивания срезов мозга из полосатого тела (Фиг. 13А), гиппокампа (Фиг. 13В) и коры (Фиг. 13С) выявили глобальную трансдукцию головного мозга модифицированным вектором.

6.11.2.3 Выводы

[00229] Модификации капсида AAV, выполненные либо путем вставок в расположенные на поверхности петли VR-IV и VR-VIII, либо путем специфических аминокислотных мутаций, не влияли на их эффективность упаковки и были способны давать аналогичные титры в системе продукции, описанной в данном документе.

[00230] Внутривенное введение AAV.hDyп мышам приводило к более высокому относительному содержанию вирусного генома и большей трансдукции клеток головного мозга, чем другие исследованные модифицированные векторы AAV и AAV9.

Таблица 6. Пептиды хоуминга, использованные в исследовании биораспределения

Название	Капсид	Расположение пептидной вставки	Название пептида	Пептидная последовательность	SEQ ID NO:
AAV9	AAV9	454_455	-	-	
AAV9 S454-P2	AAV9	454_455	Мозг 1	LSSRLDA	3
AAV9 S454-P3	AAV9	454_455	Кость2 (Мозг1С)	CLSSRLDAC	4
AAV9 S454-P4	AAV9	454_455	Почка 1	LPVAS	6
AAV9 S454-P5	AAV9	454_455	Почка2 (Почка 1С)	CLPVASC	5
AAV9 S454-P6	AAV9	454_455	Мышца 1	ASSLNIA	7
AAV9 S454-P7	AAV9	454_455	Tfr1	HAIYPRH	10
AAV9 S454-P9	AAV9	454_455	Tfr3	RTIGPSV	12
AAV9 S454-P10	AAV9	454_455	Tfr4	CRTIGPSVC	13

[00231] Модификации капсида AAV, выполненные путем вставок различных пептидов хоуминга в расположенную на поверхности петлю VR-IV, не влияли на их эффективность упаковки и были способны давать аналогичные титры в системе продукции, описанной в

данном документе.

[00232] Внутривенное введение AAV9 S454 Почки1 и AAV9 S454 Почки1С мышам приводило к более высокому относительному содержанию вирусного генома и большей трансдукции клеток почки, чем другие исследованные модифицированные векторы AAV9 и исходный вектор AAV9. Внутривенное введение вектора AAV9 S454 Почки1 или AAV9 S454 Мышцы1 мышам также приводило к снижению трансдукции клеток печени.

6.12. Пример 12 – Конструирование капсида rAAV, содержащего TLAVPFK (SEQ ID NO: 20)

[00233] На Фиг. 25 показана аминокислотная последовательность капсида рекомбинантного вектора AAV9, включающая пептидную вставку аминокислотной последовательности TLAVPFK (SEQ ID NO:20) между S454 и G455 в VR-IV.

6.13. Пример 13 – Биораспределение пула векторов rAAV у яванских макак

[00234] Введение, наблюдения *in vivo* и патологоанатомические наблюдения, а также биораспределение пула рекомбинантных AAV со сконструированными капсидами и трансгеном GFP будут оценивать после однократной внутривенной, интрацеребровентрикулярной или интравитреальной инъекции яванским макакам (Таблица 7). Пул содержит несколько капсидов, каждый из которых содержит уникальный идентификационный штрих-код, позволяющий проводить идентификацию с помощью анализа секвенирования следующего поколения (NGS) после введения яванским макакам. Яванский макак выбран в качестве тест-системы из-за его установленной пригодности и приемлемости в качестве модели для исследований биораспределения AAV у крупных видов животных и для дальнейшего переноса на человека. Все животные в этом исследовании не подвергались ранее лечению. Пул может включать по меньшей мере следующие рекомбинантные AAV, имеющие сконструированные капсиды, перечисленные в Таблице 7.

Таблица 7. Исследование рекомбинантных AAV у яванских макак

Название	Капсид	Модификация капсида	Место вставки	Пептид	Пептид SEQ ID NO:
AAV8	AAV8	-	-	-	
AAV8.BBB	Модифиц	A269S	-	-	

Название	Капсид	Модификация капсида	Место вставки	Пептид	Пептид SEQ ID NO:
	ированный AAV8				
AAV8.BBB.LD	Модифицированный AAV8	A269S, 498-NNN/AAA-500	-	-	
AAV9	AAV9	-	-	-	
AAV9 S454-Мозг1	AAV9	-	454_455	LSSRLDA	3
AAV9 S454-Мозг1C	AAV9	-	454_455	CLSSRLDAC	4
AAV9 S454-D8	AAV9	-	454_455	DDDDDDDD	2
AAV9 S454-Почки1	AAV9	-	454_455	LPVAS	6
AAV9 S454-Почки1C	AAV9	-	454_455	CLPVASC	5
AAV9 S454-Мышца1	AAV9	-	454_455	ASSLNIA	7
AAV9 S454-Tfr1	AAV9	-	454_455	HAIYPRH	10
AAV9 S454-Tfr3	AAV9	-	454_455	RTIGPSV	1219
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.N272A.496NNN/AAA49	Модифицированный	N272A, 496-NNN/AAA-			

Название	Капсид	Модификация капсида	Место вставки	Пептид	Пептид SEQ ID NO:
8	AAV9	498			
AAV9.G266A.496NNN/AAA498	Модифицированный AAV9	G266A, 496-NNN/AAA-498			
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 PHPeB	A587D, Q588G	588_589	TLAVPFK	20
PHPeB.hB					
PHPeB.S	AAV9	-	588_589	QAVRTSL	16
PHPeB.SH	AAV9	-	588_589	QAVRTSH	17

6.13.1. Схема исследования

[00235] Будут использованы девять самок яванского макака. Животные, признанные подходящими для экспериментов на основании данных клинических признаков и титров антител перед скринингом, будут помещены в исследовательские группы по массе тела с использованием случайных чисел, сгенерированных компьютером. Будут использованы три различных способа введения и собраны соответствующие ткани для оценки биораспределения (измеряемого с помощью NGS и ПЦР), связанного с различными способами. Трём животным будет имплантирован катетер в левый боковой желудочек для интрацеребровентрикулярного (ИЦВ) введения дозы (группа 1), трём животным будет проведена однократная внутривенная инфузия (группа 2), и трём животным будет проведена однократная интравитреальная инъекция (группа 3). Двое животных будут служить в качестве запасных животных и при необходимости будут имплантированы. Животным в группе 1 будет проведено МРТ-сканирование, чтобы определить координаты для правильного размещения ИЦВ катетера.

[00236] Внутривенная инфузия будет осуществляться со скоростью 3 мл/мин, а затем 0,2 мл носителя для вымывания дозы из внутривенного катетера. Трое животных с внутривенным введением получают разовую дозу пула рекомбинантных AAV в объеме 4 мл/кг. Общая доза (вг) и объем дозы (мл/кг) будут записаны в исходных данных. На основании обзора литературы и предыдущих исследований на приматах, отличных от человека, было установлено, что внутривенная доза 1×10^{13} ГК/кг массы тела необходима для желаемого распределения в ЦНС при системном введении, а также в периферических тканях, включая скелетные мышцы.

[00237] Имплантированные ИЦВ животные получают однократную болюсную дозу в объеме 1 мл AAV-NAV-GFPbc (путем медленной инфузии, приблизительно 0,1 мл/мин), а затем 0,1 мл носителя для вымывания дозы из системы катетера. ИЦВ доза основана на данных о распределении из предыдущего исследования на приматах, отличных от человека, для поддержки текущих клинических программ.

[00238] Интравитреальную инъекцию (ИВТ) будут вводить двусторонне в виде болюсной инъекции в объеме дозы 50 мкл.

6.13.2. Наблюдения и исследования

[00239] Клинические признаки будут регистрировать по меньшей мере один раз в день, начиная примерно за две недели до начала дозирования и продолжая в течение всего периода исследования. За животными будут наблюдать на наличие признаков клинических эффектов, болезни и/или смерти. Дополнительные наблюдения могут быть зарегистрированы в зависимости от состояния животного по усмотрению руководителя

исследования и/или специалистов.

[00240] Офтальмологические исследования будут проводить у животных группы 3 до введения дозы и в дни 2, 8, 15 и 22. Всем животным вводят внутримышечно гидрохлорид кетамина для офтальмологических обследований, проводимых после 1-го дня. Для осмотров в 1-й день животным усыпят инъекционной анестезией (см. Раздел 15.3.3). Перед обследованием глаза расширяют зрачок 1% тропикамидом. Обследование будет включать биомикроскопию с помощью щелевой лампы и непрямую офтальмоскопию. Кроме того, будут проводить аппланационную тонометрию у животных группы 3 перед введением дозы, сразу после введения дозы (примерно через 10–15 минут) и в дни 2 и 22.

[00241] Образцы крови (~ 3 мл) будут взяты из периферической вены для анализа нейтрализующих антител примерно за 2–3 недели до введения дозы.

6.13.3. Сбор образцов для биоаналитического анализа

[00242] Образцы цельной крови (~0,5 мл) будут взяты из периферической вены для биоаналитического анализа (клиренс капсида AAV) до введения дозы, через 3 (± 10 минут), 6 (± 10 минут) и 24 ($\pm 0,5$ часа) часа после введения дозы только у животных из группы 2 (IV). Образцы будут собраны с помощью шприца и иглы, перенесены в две пробирки K₂ с ЭДТА, и время будет записано.

[00243] Образцы крови (~ 5 мл) будут брать у животных натошак из периферической вены для анализа МКПК перед введением дозы (день 1), в дни 8 и 15 и перед вскрытием (день 22). Образцы будут получены с использованием пробирок с литий-гепарином, а время записано.

[00244] Образцы крови будут взяты из периферической вены для биоаналитического анализа до введения дозы (день 1, 2 мл) и вскрытия (день 22, 5 мл). Образцы будут собраны в пробирки с активатором свертывания, а время записано. Пробирки выдерживают при комнатной температуре до полного свертывания, затем центрифугируют при приблизительно 2400 об/мин при комнатной температуре в течение 15 минут. Сыворотку собирают, помещают в маркированные виалы (образец вскрытия разделяют на аликвоты по 1 мл), замораживают в жидком азоте и хранят при температуре -60°C или ниже.

[00245] СМЖ (~1,5 мл) будет взята перед введением дозы из спинномозговой пункции из мостомозжечковой цистерны у животных только в группе 1. СМЖ (~ 2 мл) будет взята непосредственно перед вскрытием из спинномозговой пункции мостомозжечковой цистерны у всех животных (группы 1-3). Будет предпринята попытка собрать СМЖ, но из-за неудачной спинномозговой пункции образцы не могут быть взяты через все промежутки времени у животного(ых). После сбора образцы будут хранить на льду до обработки.

6.13.4. Вскрытие

[00246] Макроскопическое вскрытие будут проводить на любом животном, найденном

мертвым или умерщвленным, а также при запланированном вскрытии, по меньшей мере, после 21 дня лечения (день 22). Всем животным, за исключением обнаруженных мертвыми, вводят в/м 8 мг/кг кетамина HCl, поддерживают на смеси изофлюран/кислород и внутривенно болюсно вводят гепарин натрия, 200 МЕ/кг. Животных перфузируют через левый сердечный желудочек 0,001% нитрита натрия в физиологическом растворе. Животных, найденных мертвыми, подвергают вскрытию, но не перфузии.

[00247] От всех животных (в том числе найденных мертвыми) будут собраны следующие ткани: костный мозг, головной мозг, слепая кишка, толстая кишка, ганглии дорсальных корешков и дорсальные корешки нервов, двенадцатиперстная кишка, пищевод, глаза со зрительными нервами, обширные 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.

6.13.5. Биоаналитический анализ

[00248] Цельную кровь, собранную у животных группы 2 (IV), будут оценивать с помощью кПЦР и секвенирования следующего поколения (NGS).

[00249] При необходимости, образцы РВМС, собранные у всех животных, будут оценивать с помощью проточной цитометрии и метода иммуноферментных пятен (ELISpot).

[00250] Присутствие нейтрализующих антител в кровотоке, а также свободного вектора в сыворотке и/или СМЖ будет оцениваться с помощью ИФА и клеточных анализов, при необходимости.

[00251] Количество копий вектора и количество транскриптов в тканях будут исследовать методами кПЦР и NGS.

6.14. Пример 14 - Исследование биораспределения в ЦНС при внутривенном введении.

[00252] Процедуру, подобную той, что описана в Примере 13, использовали для исследования биораспределения пула капсидов гAAV, введенных внутривенно модели яванского макака. Некоторые капсиды демонстрировали хорошее распространение в ЦНС с высоким относительным содержанием (ОС по сравнению с эталонным капсидом AAV9) в большинстве областей мозга, особенно AAV4, AAV5, rh 34, hu 26, rh31 и hu13. Подходящие капсиды, проявляющие тропизм к ЦНС, имеют значения ОС ДНК, что приводит к увеличению значений ДНК более чем в 1,1 раз по меньшей мере в одной области ЦНС, за исключением ганглия дорсальных корешков (DRG).

[00253] На **Фиг. 15** показано относительное содержание (ОС) вирусных геномов

(нормализованное к введенным) в лобной коре головного мозга модели яванского макака, а в **Таблице 8** приведены значения ОС для капсидов с самым высоким ОС, показанным на 15 Фиг.

Таблица 8:

Образец №	Серотип	Относительное содержание	p-значение
BC085	AAV4	32643,06	<0,0001
BC086	AAV5	836,64	0,0043
BC076	AAV.rh34	735,19	0,0296
BC049	AAV.hu26	606,37	н.з.
BC059	AAV.hu56	518,54	н.з.
BC057	AAV.hu53	444,2	н.з.
BC088	AAV7	427,28	н.з.
BC003	AAV8.BBB	359,84	н.з.
BC044	AAV.hu13	341,58	н.з.
BC075	AAV.rh31	339,86	н.з.

[00254] . На **Фиг. 16 и 17** показаны ОС (относительное содержание) вирусных геномов (нормализованное к введенным) в гиппокампе и мозжечке модели яванских макаков, соответственно. ОС AAV.rh34 показано заштрихованным столбцом в левой части графиков, а ОС эталонного AAV9 показано заштрихованным столбцом в середине графиков. На **Фиг. 16 и 17** показано, что AAV.rh34 является наиболее эффективным капсидом в пуле для внутривенного введения.

[00255] AAV.rh34 также продемонстрировал благоприятный профиль в отношении токсичности ЦНС. Капсид rh34 показал сниженную трансдукцию в ганглиях дорсальных корешков (DRG), в то же время демонстрируя высокий тропизм к лобной коре (эффективность трансдукции). AAVrh34 демонстрирует повышенное ОС по сравнению с AAV9 в областях ЦНС следующим образом: в 1,8 раз в гиппокампе, в 7,4 раза в лобной коре, в 1,9 раз в миндалинах, в 6,0 раз в костном мозге, в 3,1 раз в среднем мозге, в 1,2 раза в гипоталамусе, в 8,8 раз в таламусе, в 13 раз в бледном шаре, в 5,7 раз в компактной части черной субстанции (Snc; англ.: Substantia nigra pars compacta), в 3,5 раз в дорсальном шве, в 2,0 раза в клауструме, в 13 раз в путамене, в 9 раз в затылочной коре и в 9,6 раза в мозжечке. Кроме того, AAVrh34 демонстрирует снижение ОС в: DRG: 90–99,5%, печени: ~ 99%,

бицепсе: ~ 30%, седалищном нерве: 83% и зрительном нерве: 17%.

[00256] На Фиг. 18 показана диаграмма Венна: 45 наиболее эффективных исполнений в ЛК (самое высокое ОС для AAV9) и 45 наименее эффективных исполнений в шейных, грудных и поясничных DRG (самое низкое ОС для AAV9), а капсид AAVrh34 показан как единственный капсид, который присутствовал в каждой группе из 45-ти среди пула капсидов. Капсиды AAV с комбинацией этих перечисленных характеристик считаются «благоприятными для DRG» капсидами, так что их низкий уровень трансдукции в DRG должен иметь минимальную нейротоксичность и/или сниженные или незначительные симптомы аксонопатии у субъекта, которому вводили капсид AAV.

6.15. Пример 15: Исследование биораспределения в ЦНС при интрацеребровентрикулярном (ИЦВ) введении.

[00257] Процедуру, подобную той, что описана в Примере 13, с ИЦВ введением использовали для исследования биораспределения пула капсидов rAAV на модели яванского макака. Некоторые капсиды демонстрировали хорошее распространение в ЦНС с высоким относительным содержанием (ОС по сравнению с эталонным капсидом AAV9) в большинстве областей мозга, особенно AAV4, AAV5, rh 34, hu 26, rh31 и hu13. Подходящие капсиды, проявляющие тропизм к ЦНС, имеют значения относительного содержания ДНК, что приводит к увеличению значений ДНК более чем в 1,1 раз по меньшей мере в одной области ЦНС, за исключением ганглия дорсальных корешков (DRG).

[00258] На Фиг. 19 показано ОС вирусных геномов (нормализованное к введенным) в лобной коре головного мозга модели яванского макака, а в Таблице 9 приведены значения ОС для капсидов с самым высоким ОС, показанным на Фиг. 19.

Таблица 9.

Образец №	Серотип	ОС	p-значение
BC083	AAV1	1499,86	<0,0001
BC003	AAV8.BBB	762,42	0,0151
BC077	AAV.rh4	659,09	н.з.
BC054	AAV.hu38	638,06	н.з.
BC086	AAV5	612,54	н.з.
BC079	AAV.rh46	588,72	н.з.
BC089	AAV8.BBB	574,48	н.з.

BC087	AAV6	520,67	н.з.
BC081	AAV.rh72	512,76	н.з.

[00259] На Фиг. 20 показано относительное содержание вирусных геномов (нормализованное к введенным) в гиппокампе модели яванского макака, а в Таблице 10 приведены значения ОС для капсидов с самым высоким ОС, которые показаны на Фиг. 20.

[00260] Таблица 10.

Сортированные BC	Нормализованное сортированное относительное содержание	Серотип	p-значение
BC105	125921,21	AAV2	н.з.
BC062	81149,18	AAV2 7m8	н.з.
BC087	50962,40	AAV6	н.з.
BC083	25800,48	AAV1	н.з.
BC032	8113,37	AAVrh2	н.з.
BC126	4169,21	AAVrh73	н.з.
BC102	3673,77	AAV8Y733F	н.з.
BC085	3397,77	AAV4	н.з.
BC003	3279,18	AAV8.BBB	0,007
BC073	2609,49	AAVrh24	н.з.

[00261] На Фиг. 21 показано относительное содержание (ОС) вирусных геномов (нормализованное к введенным) в среднем мозге модели яванского макака, а в Таблице 11 приведены значения ОС для капсидов с самым высоким ОС, показанные на Фиг. 21.

[00262] Таблица 11.

Сортированные BC	Нормализованное сортированное относительное содержание	Серотип	p-значение
BC062	2077,07	AAV 7m8	<0,0001
BC085	1057,83	AAV4	0,0002
BC087	859,50	AAV6	0,0104

Сортированные ВС	Нормализованное сортированное относительное содержание	Серотип	p-значение
BC015	833,34	AAV27m8	0,0164
BC086	827,35	AAV5	0,0181
BC096	417,06	AAV8 Y444F	0,9781
BC098	407,57	AAV8 Y447F	н.з.
BC079	383,98	AAVrh46	н.з.
BC083	301,08	AAV1	н.з.
BC102	295,67	AAV8 Y733F	н.з.

[00263] На Фиг. 22 показано ОС вирусных геномов (нормализованное к введенным) в мозжечке модели яванского макака, а в Таблице 12 приведены значения ОС для капсидов с самым высоким ОС, показанные на Фиг. 22.

[00264] Таблица 12.

Сортированные ВС	Нормализованное сортированное ОС	Серотип	p-значение
BC083	1170,50	AAV1	<0,0001
BC003	671,84	AAV8.BBB	<0,0001
BC077	531,50	AAV rh4	0,0004
BC079	515,31	AAVrh46	0,0008
BC054	510,51	AAVhu38	0,001
BC100	479,36	AAV8Y707F	0,0038
BC127	470,57	AAVrh2.R1.V651F	0,0054
BC081	467,79	AAVrh72	0,006
BC053	447,81	AAVhu37	0,0128
BC091	445,93	AAV9Y6F	0,0137

[00265] На Фиг. 23 показано ОС вирусных геномов (нормализованное к введенным) в шейных DRG модели яванского макака, а в Таблице 13 приведены значения ОС для капсидов с самым высоким ОС, показанные на Фиг. 23.

[00266] Таблица 13.

Сортированные BC	Нормализованное сортированное OC	Серотип	p-значение
BC062	12040,24	AAV2 7m8	<0,0001
BC015	9522,20	AAV2	<0,0001
BC126	7170,76	AAVrh73	н.з. (0,2422)
BC086	4760,90	AAV5	<0,0001
BC084	2640,55	AAV3B	н.з.
BC083	1808,40	AAV1	н.з.
BC003	1192,23	AAV8.BBB	н.з.
BC085	922,02	AAV4	н.з.
BC087	875,60	AAV6	н.з.
BC077	826,27	AAVrh4	н.з.

[00267] На Фиг. 24 показано OC вирусных геномов (нормализованное к введенным) в поясничных DRG модели яванского макака, а в Таблице 14 приведены значения OC для капсидов с самым высоким OC, показанные на Фиг. 24.

[00268] Таблица 14.

Сортированные BC	Нормализованное сортированное OC	Серотип	p-значение
BC015	5649,13	AAV2	н.з. (0,9996)
BC126	4840,36	AAVrh73	<0,0001
BC083	4002,82	AAV1	0,0021
BC086	3794,13	AAV5	0,0051
BC003	2847,53	AAV8.BBB	н.з.
BC131	2427,59	AAVrh64.R1	н.з.
BC062	2367,34	AAV2 7m8	н.з.
BC100	2000,82	AAV8 Y707F	н.з.
BC077	1988,30	AAV rh4	н.з.
BC053	1947,15	AAVhu37	н.з.

[00269] На Фиг. 25 показана диаграмма Венна 15 наиболее эффективных капсидов, трансдуцирующих лобную кору, гиппокамп, средний мозг и мозжечок после ИЦВ введения. Как показано на диаграмме, AAV6, AAV8.BBB, AAV.rh.46 и AAV1 были

единственными AAV, представленными в каждой из наиболее эффективных групп.

[00270] На Фиг. 26 показана диаграмма Венна 45 наиболее эффективных капсидов, трансдуцирующих гиппокамп, и 45 капсидов с самыми низкими значениями трансдукции для DRG, для выявления благоприятных для DRG капсидов, нацеленных на гиппокамп. Как показано на диаграмме, AAV.hu.60, AAV.rh.21, AAV.PHP.hB, AAV.rh.15, AAV.rh.24, AAV9.W503R, hu.5, AAV9.Q474A и AAV.hu.10 были единственными AAV, представленными в каждой из групп.

6.16. Пример 16 - Исследование биораспределения в мышцах и печени при внутривенном (в/в) введении.

[00271] Процедуру, подобную описанной в Примере 13, с в/в введением использовали для изучения биораспределения пула капсидов гAAV в мышцах и печени на модели яванского макака.

[00272] На Фиг. 27 показана диаграмма Венна 40 наиболее эффективных капсидов, трансдуцирующих сердце, бицепс и икроножную мышцу, и 40 капсидов с самыми низкими значениями трансдукции для печени, для выявления благоприятных для печени капсидов, нацеленных на мышцы. Как показано на диаграмме, AAV.PHPeB.VP2Herp был единственным AAV, представленным в каждой из групп.

[00273] На Фиг. 28 показана диаграмма Венна 15 наиболее эффективных капсидов, трансдуцирующих сердце, бицепс и икроножную мышцу, а в Таблице 15 приведен список наиболее эффективных капсидов в трех разных областях диаграммы.

Таблица 15.

Область диаграммы	Общее кол-во	Серотип
бицепс, икроножная мышца, сердце	4	Hu.10, AAV3B, AAV2.7m8, AAV9.Q474A
бицепс, икроножная мышца	1	AAV5
сердце	3	Rh.15, PHP.hB, модифицированный AAV8

[00274] На Фиг. 29А и В показано ОС (относительное содержание) вирусных геномов (нормализованное к введенным) в икроножной мышце и печени модели яванского макака, соответственно.

[00275] В Таблице 16 представлен ранг каждого капсида по значениям ОС для модели

яванского макака и мышинной модели MDX. Капсиды были ранжированы относительно друг друга у каждого животного, чтобы уменьшить вариабельность между животными. Икроножная мышца, поперечная мышца живота (ТА, англ.: transverse abdominal), сердце, бицепс и трицепс внесли 70% в ранжирование для мышинной модели MDX, а икроножная мышца, сердце и бицепс внесли 70% в ранжирование для модели яванского макака. ОС в печени вносило 30% в ранжирование для каждого животного. Общее ранжирование было определено путем взвешивания ранжирования для каждого животного на 50%.

Таблица 16.

Серотип	Ранг NH/яван. макака	MDX Ранг	Общий Ранг
AAV9.W503R	3	1	1
AAV9.Q474A	4	10	3
AAV9.BBB	15	2	4
AAV9 S454- Почки 1	2	21	7
AAV.hu32	7	17	9
AAV.rh13	24	5	12
AAV.rh15	8	25	13
AAV9 S454- Почки 1C	5	31	17
AAV9	36	6	18

6.17. Пример 17: Исследование биораспределения без воздействия на печень после внутривенного введения библиотеки капсидов

[00276] Пул векторов со штрих-кодами вводили в приматам, отличным от человека (NHP, англ.: non-human primate) путем в/в инъекции. Смесь пула состоит из 118 различных капсидов AAV, включая природные изоляты и сконструированные AAV, как описано в данном документе, экспрессирующих репортерный ген GFP при помощи универсального промотора CAG. Внутривенное исследование проводили по протоколу, описанному в Примерах 13 и 14 ниже. Несколько капсидов проявляли тропизм, который «не воздействовал» печень, поэтому мутировавшие капсиды демонстрировали меньшее содержание в ткани печени, чем исходный капсид (AAV9), например, AAV8.BBB.LD

(A269S, 498-NNN/AAA-500), AAV9.BBB.LD (S263G/S269T/A273T, 496-NNN/AAA-498), AAV9.496-NNN-498, AAV9.496-NNN-498.W503R, AAV9.W503R и AAV9.Q474A. Капсиды AAV8, имеющие мутацию NNN/AAA, демонстрируют в целом снижение трансдукции в печени приблизительно в 11 раз и снижение экспрессии транскрипта в печени в 42 раза. Капсиды AAV9, имеющие мутацию NNN/AAA и W503R, демонстрируют в целом снижение трансдукции в печени приблизительно в 400 раз и приводят к нулевой экспрессии транскрипта в печени. В некоторых случаях также уменьшалось распределение этих модифицированных векторов в головном мозге. AAV8.BBB.LD дополнительно демонстрирует высокий уровень трансдукции в икроножной мышце.

[00277] На **Фиг. 31** показано биораспределение выбранных векторов, «не воздействующих на печень» (LD, англ.: liver detargeting), по сравнению с их исходным капсидом AAV9 в различных тканях, у NHP после в/в введения библиотеки капсидов. На **Фиг. 32** показано биораспределение выбранных LD-векторов по сравнению с их исходным капсидом AAV8 в различных тканях у NHP после в/в введения библиотеки капсидов.

[00278] Исследования также показывают изменение относительного содержания (с поправкой на введенное, нормализованное к 1) между содержанием каждого штрих-кода (и, следовательно, капсида) через 3 часа после и через 24 часа после в/в введения библиотеки капсидов (OC через 3 часа/OC через 24 часа). Отдельные животные обозначены точками данных различной формы (всего 3 животных) (**Фиг. 33А и 33В**).

[00279] Кратность изменения >1 указывает на то, что капсид составляет меньший процент от общего «пула» капсидов, присутствующего в крови через 24 часа, по сравнению с 3 часами после введения дозы (т. е. более быстрый клиренс из крови). Кратность изменения < 1 указывает на то, что капсид составляет больший процент от общего «пула» капсидов, присутствующего в крови через 24 часа, по сравнению с 3 часами после введения дозы (т. е. более медленный клиренс). Исторически сложилось так, что более медленный клиренс коррелирует с более низкой трансдукцией/ не воздействием на печень.

[00280] Изображение изменения содержания данного капсида у данного животного было нанесено на график, представленное увеличением удержания в крови. С учетом расчета кратного увеличения удержания в крови по сравнению с исходным уровнем удержания AAV9, например, изображения (**Фиг. 34А и 34В**) сравнивают это изменение значения содержания выбранного капсида с изменением содержания исходного капсида (исходный капсид принят за 1). Таким образом, различные мутации капсида AAV9 увеличивают удержание в кровотоке в 3-5 раз (см., например, **Фиг. 34А**).

6.18 Пример 18 - Исследование биораспределения в мышцах, печени и головном мозге при внутривенном (в/в) введении пула капсидов мышам *mdx*

[00281] Пул векторов со штрих-кодами вводили мышам *mdx* путем в/в инъекции (в хвостовую вену). Смесь пула состоит из 118 различных капсидов AAV, включая природные изоляты и сконструированные AAV, как описано в данном документе, экспрессирующих репортерный ген GFP при помощи универсального промотора CAG. В исследовании IV следовали протоколу, аналогичному протоколу, описанному в Примерах 12 и 16 *ниже*.

[00282] На 3-й неделе после умерщвления собирали ткани и отбирали образцы в пробирки с RNAlater (в соответствии с инструкциями производителя) и мгновенно замораживали при -80°C до проведения анализа ДНК и РНК (биораспределение каждого вектора в пуле) с помощью NGS (см. **Фиг. 36А-36Н**).

6.19 Аминокислотные последовательности капсида

[00283] В **Таблице 17** представлены аминокислотные последовательности некоторых сконструированных капсидных белков, описанных и/или использованных в исследованиях, описанных в данном документе. Гетерологичные пептиды и аминокислотные замены обозначены серым цветом.

Таблица 17. Аминокислотные последовательности капсида

Название капсида	Вставка или замена	Аминокислотная последовательность
PHP.S (Калифорнийский технологический институт - Chan et al 2017)	QAVRT SL (SEQ ID NO:16) (588_589)	1 MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWALKPGAP QPKANQQHQD NARGLVLPGY KYLGPNGLD 61 KGEPVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNPY LKYNHADA EF QERLKEDTSF GGNLGRAV FQ 121 AKKRLLEPLG LVEEAAKTAP GKKRPVEQSP QEPDSSAGIG KSGAQPAKKR LNFGQTGDTE 181 SVPDPQPIGE PPAAPSGVGS LTMASGGGAP VADNNEGADG VGSSSGNWHC DSQWLGD RVI 241 TTSTRTWALP TYNNHLYKQI SNSTSGGSSN DNAYFGYSTP WGYDFNRFH CHFSPRDWQR 301 LINNNWGF RP KRLNFKLFNI QVKEVTDNNG VKTIANNLTS TVQVFTDSY QLPYVLGSAH 361 EGCLPPFPAD VFMI PQYGYL TLNDGSQAVG RSSFYCLEYF PSQMLRTGNN FQFSYEFENV 421 PFHSSYAHSQ SLDRLMNPLI DQYLYLSRT INSGSQNQQT LKFSVAGPSN MAVQGRNYIP 481 GPSYRQQRVS TTVTQNNNSE FAWPGASSWA LN GRNSLMNP GPAMASHKEG EDRFFPLSGS 541 LIFGKQGTGR DNVADK VMI TNEEIKTTN PVATESYGQV ATNHQSAQQA VRTSLAQ AQT 601 GWVQNQGILP GMVWQDRDVY LQGPWAKIP HTDGNFHPSP LMGGFGMKHP PPQILIKNTP 661 VPADPPTAFN KDKLNSFITQ YSTGQVSVEI EWELQKENS K RWNPEIQYTS NYYSNNVEF 721 AVNTEGVYSE PRPIGTRYLT RNL (SEQ ID NO:22)
PHP.SH	QAVRT SH (SEQ ID NO:17) (588_589)	1 MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWALKPGAP QPKANQQHQD NARGLVLPGY KYLGPNGLD 61 KGEPVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNPY LKYNHADA EF QERLKEDTSF GGNLGRAV FQ 121 AKKRLLEPLG LVEEAAKTAP GKKRPVEQSP QEPDSSAGIG KSGAQPAKKR LNFGQTGDTE 181 SVPDPQPIGE PPAAPSGVGS LTMASGGGAP VADNNEGADG VGSSSGNWHC DSQWLGD RVI 241 TTSTRTWALP TYNNHLYKQI SNSTSGGSSN DNAYFGYSTP WGYDFNRFH CHFSPRDWQR 301 LINNNWGF RP KRLNFKLFNI QVKEVTDNNG VKTIANNLTS TVQVFTDSY QLPYVLGSAH 361 EGCLPPFPAD VFMI PQYGYL TLNDGSQAVG RSSFYCLEYF PSQMLRTGNN FQFSYEFENV 421 PFHSSYAHSQ SLDRLMNPLI DQYLYLSRT INSGSQNQQT LKFSVAGPSN MAVQGRNYIP 481 GPSYRQQRVS TTVTQNNNSE FAWPGASSWA LN GRNSLMNP GPAMASHKEG EDRFFPLSGS

Название капсида	Вставка или замена	Аминокислотная последовательность
		541 LIFGKQGTGR DNVADK VMI TNEEEIKTTN PVATESYGQV ATNHQSAQQA VRTSHAQAQT 601 GWVQNQGILP GMVWQDRDVY LQGPIWAKIP HTDGNFHPSP LMGGFGMKHP PPQILIKNTP 661 VPADPPTAFN KDKLNSFITQ YSTGQVSVEI EWELQKENS K RWNPEIQYTS NYYSNNVEF 721 AVNTEGVYSE PRPIGTRYLT RNL (SEQ ID NO:23)
PHP.B <i>(Запись Калифорнийско го технологическо го института GenBank: ALU851 56.1 - Deverman et al 2016)</i>	TLAVP FK (SEQ ID NO:20) (588_58 9)	1 MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWALKPGAP QPKANQQHQD NARGLVLPY KYLGPNGLD 61 KGEPVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNPY LKYNHADA EF QERLKEDTSF GGNLGRAVFQ 121 AKKRLLLEPLG LVEEAAKTAP GKKRPVEQSP QEPDSSAGIG KSGAQPAKRR LNFGQTGDTE 181 SVPDPQPIGE PPAAPSGVGS LTMASGGGAP VADNNEGADG VGSSSGNWHC DSQWLGD RVI 241 TTSTRTWALP TYNNHLYKQI SNSTSGGSSN DNAYFGYSTP WGYFDFNRFH CHFSPRDWQR 301 LINNNWGF RP KRLNFKLFNI QVKEVTDNNG VKTIANNLTS TVQVFTDSY QLPYVLGSAH 361 EGCLPPFPAD VFMIPQYGYL TLNDGSQAVG RSSFYCLEYF PSQMLRTGNN FQFSYEFENV 421 PFHSSY AHSQ SLDRLMNPLI DQYLYLSRT INSGSQNQQT LKFSVAGPSN MAVQGRNYIP 481 GPSYRQQRVS TTVTQNNNSE FAWPGASSWA LNGRNSLMNP GPAMASHKEG EDRFFPLSGS 541 LIFGKQGTGR DNVADK VMI TNEEEIKTTN PVATESYGQV ATNHQSAQTL AVPFKAQAQT 601 GWVQNQGILP GMVWQDRDVY LQGPIWAKIP HTDGNFHPSP LMGGFGMKHP PPQILIKNTP 661 VPADPPTAFN KDKLNSFITQ YSTGQVSVEI EWELQKENS K RWNPEIQYTS NYYSNNVEF 721 AVNTEGVYSE PRPIGTRYLT RNL (SEQ ID NO:24)
PHP.eB <i>(Калифорнийски й технологически й институт - Chan et al 2017)</i>	TLAVP FK (SEQ ID NO: 27) (588_58 9)	1 MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWALKPGAP QPKANQQHQD NARGLVLPY KYLGPNGLD 61 KGEPVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNPY LKYNHADA EF QERLKEDTSF GGNLGRAVFQ 121 AKKRLLLEPLG LVEEAAKTAP GKKRPVEQSP QEPDSSAGIG KSGAQPAKRR LNFGQTGDTE 181 SVPDPQPIGE PPAAPSGVGS LTMASGGGAP VADNNEGADG VGSSSGNWHC DSQWLGD RVI 241 TTSTRTWALP TYNNHLYKQI SNSTSGGSSN DNAYFGYSTP WGYFDFNRFH CHFSPRDWQR 301 LINNNWGF RP KRLNFKLFNI QVKEVTDNNG VKTIANNLTS TVQVFTDSY QLPYVLGSAH 361 EGCLPPFPAD VFMIPQYGYL TLNDGSQAVG RSSFYCLEYF PSQMLRTGNN FQFSYEFENV 421 PFHSSY AHSQ SLDRLMNPLI DQYLYLSRT INSGSQNQQT LKFSVAGPSN MAVQGRNYIP 481 GPSYRQQRVS TTVTQNNNSE FAWPGASSWA LNGRNSLMNP GPAMASHKEG EDRFFPLSGS 541 LIFGKQGTGR DNVADK VMI TNEEEIKTTN PVATESYGQV ATNHQSDGTL AVPFKAQAQT 601 GWVQNQGILP GMVWQDRDVY LQGPIWAKIP HTDGNFHPSP LMGGFGMKHP PPQILIKNTP 661 VPADPPTAFN KDKLNSFITQ YSTGQVSVEI EWELQKENS K RWNPEIQYTS NYYSNNVEF 721 AVNTEGVYSE PRPIGTRYLT RNL (SEQ ID NO:25)
AAV8.B BB	A269S	MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWALKPGAP KPKANQQKQD DGRGLVLPY KYLGPFNGLD 60 KGEPVNAADA AALEHDKAYD QQLQAGDNPY LRYNHADA EF QERLQEDTSF GGNLGRAVFQ 120 AKKRVLLEPLG LVEEGA KTAP GKKRPVEPSP QRSPDSSGTI GKKGQPPARK RLNFGQTGDS 180 ESVPDPQPLG EPPAAPSGVG PNTMAAGGGA PMADNNEGAD GVGSSSGNWH CDSTWLGDRV 240 ITSTRTWAL PTYNNHLYKQ ISNGTSGGST NDNTYFGYST PWGYFDFNRF HCHFSPRDWQ 300 RLINNNWGF RP KRLSFKLFNI IQVKEVTQNE GTKTIANNLT STIQVFTDSE YQLPYVLGSA 360 HQGCLPPFPA DVFMIPQYGY LTLNNGSQAV GRSSFYCLEY FPSQMLRTGN NFQFTYTFED 420 VPFHSSY AHS QSLDRLMNPL IDQYLYLSR TQTTGGTANT QTLGFSQGGP NIMANQAKNW 480 LPGPCYRQQR VSTTTGQNNN SNFAWTAGTK YHLNGRNSLA NPGIAMATHK DDEERFFPSN 540 GILIFGKQNA ARDNADYSDV MLTSEEEIKT TNPVATEEYIVADNLQQQN TAPQIGTVNS 600 QGALPGMVWQ NRDVYLOGPI WAKIPHTDGN FHPSPLMGGF GLKHPPPQIL IKNTPVPADP 660 PTTFNQSKLN SFITQYSTGQ VSVEIEWELQ KENSKRWNPE IQYTSNYYS TSVDFAVNTE 720 GVYSEPRPIG TRYLTRNL (SEQ ID NO:26)

Название капсида	Вставка или замена	Аминокислотная последовательность
AAV8.B BB. LD	A269S, 498_NN N/ AAA_50 0	MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWALKPGAP KPKANQQKQD DGRGLVLPY KYLGPFGNGLD 60 KGEPVNAADA AALEHDKAYD QQLQAGDNPY LRYNHADA EF QERLQEDTSF GGNLGRAVFQ 120 AKKRVLEPLG LVEEAKTAP GKKRPVEPSP QRSPDSSTGI GKKGQQPARK RLNFGQTGDS 180 ESVPDPQPLG EPPAAPSGVG PNTMAAGGGA PMADNNEGAD GVGSSSGNWH CDSTWLGDRV 240 ITTSTRTWAL PTYNNHLYKQ ISNGTSGGST NDNTYFGYST PWGYFDNRF HCHFSPRDWQ 300 RLINNNWGFR PKRLSFKLFN IQVKEVTQNE GTKTIANNLT STIQVFTDSE YQLPYVLGSA 360 HQGCLPPFPA DVFMIPQYGY LTLNNGSQAV GRSSFYCLEY FPSQMLRTGN NFQFTYTFED 420 VPFHSSY AHS QSLDRLMNPL IDQYLYLSR TQTTGGTANT QTLGFSQGGP NTMANQAKNW 480 LPGPCYRQQR VSTTTGQAAA SNFAWTAGTK YHLNGRNSLA NPGIAMATHK DDEERFFPSN 540 GILIFGKQNA ARDNADYSDV MLTSEEEIKT TNPVATEEY G IVADNLQQQN TAPQIGTVNS 600 QGALPGMVWQ NRDVYLQGP I WAKIPHTDGN FHPSPLMGGF GLKHPPPQIL IKNTVPADP 660 PTTFNQSKLN SFITQYSTGQ VSVEIEWELQ KENSKRWNP E IQYTSNYYS TSVDFAVNTE 720 GVYSEPRPIG TRYLTRNL (SEQ ID NO:27)
AAV9.B BB	S263G/ S269T/ A273T	MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWALKPGAP QPKANQQHQD NARGLVLPY KYLGPFGNGLD 60 KGEPVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNPY LKYNHADA EF QERLKEDTSF GGNLGRAVFQ 120 AKKRLEPLG LVEEAAKTAP GKKRPVEQSP QEPDSSAGIG KSGAQPAKKR LNFGQTGDTE 180 SVPDPQPIGE PPAAPSGVGS LTMASGGGAP VADNNEGADG VGSSSGNWHC DSQWLGD RVI 240 TTSTRTWALP TYNNHLYKQ I SNGTSGGSTN DNTYFGYSTP WGYFDNRFH CHFSPRDWQR 300 LINNNWGFRP KRLNFKLFN I QVKEVTDNNG VKTIANNLTS TVQVFTDSY QLPYVLGSAH 360 EGCLPPFPAD VFMIPQYGYL TLNDGSQAVG RSSFYCLEYF PSQMLRTGNN FQFSYEFENV 420 PFHSSY AHSQ SLDRLMNPL I DQYLYLSKT INSGGQNQQT LKFSVAGPSN MAVQGRNYIP 480 GPSYRQQRVS TTVTQNNNSE FAWPGASSWA LNGRNSLMNP GPAMASHKEG EDRFFPLSGS 540 LIFGKQGTGR DNVDADKVM I TNEEEIKTTN PVATESYQV ATNHQSAQAQ AQTGWVQNQG 600 ILPGMVWQDR DVYLQGP IWA KIPHTDGNFH PSPLMGGFGM KHPPPQILIK NTPVPADPPT 660 AFNKDKLNSF ITQYSTGQVS VEIEWELQKE NSKRWNPEIQ YTSNYYSKSN VEFVANTEGV 720 YSEPRPIGTR YLTRNL (SEQ ID NO:28)
AAV9.B BB. LD	S263G/ S269T/ A273T, 496_NN N/ AAA_49 8	MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWALKPGAP QPKANQQHQD NARGLVLPY KYLGPFGNGLD 60 KGEPVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNPY LKYNHADA EF QERLKEDTSF GGNLGRAVFQ 120 AKKRLEPLG LVEEAAKTAP GKKRPVEQSP QEPDSSAGIG KSGAQPAKKR LNFGQTGDTE 180 SVPDPQPIGE PPAAPSGVGS LTMASGGGAP VADNNEGADG VGSSSGNWHC DSQWLGD RVI 240 TTSTRTWALP TYNNHLYKQ I SNGTSGGSTN DNTYFGYSTP WGYFDNRFH CHFSPRDWQR 300 LINNNWGFRP KRLNFKLFN I QVKEVTDNNG VKTIANNLTS TVQVFTDSY QLPYVLGSAH 360 EGCLPPFPAD VFMIPQYGYL TLNDGSQAVG RSSFYCLEYF PSQMLRTGNN FQFSYEFENV 420 PFHSSY AHSQ SLDRLMNPL I DQYLYLSKT INSGGQNQQT LKFSVAGPSN MAVQGRNYIP 480 GPSYRQQRVS TTVTQAAA SE FAWPGASSWA LNGRNSLMNP GPAMASHKEG EDRFFPLSGS 540 LIFGKQGTGR DNVDADKVM I TNEEEIKTTN PVATESYQV ATNHQSAQAQ AQTGWVQNQG 600 ILPGMVWQDR DVYLQGP IWA KIPHTDGNFH PSPLMGGFGM KHPPPQILIK NTPVPADPPT 660 AFNKDKLNSF ITQYSTGQVS VEIEWELQKE NSKRWNPEIQ YTSNYYSKSN VEFVANTEGV 720 YSEPRPIGTR YLTRNL (SEQ ID NO:29)
AAVrh. 10.LD	498_NN N/ AAA_50 0	MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWDLKPGAP KPKANQQKQD DGRGLVLPY 50 KYLGPFGNGLD KGEPVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNPY LRYNHADA EF 100 QERLQEDTSF GGNLGRAVFQ AKKRVLEPLG LVEEAKTAP GKKRPVEPSP 150 QRSPDSSTGI GKKGQQPAKK RLNFGQTGDS ESVPDPQPIG EPPAGPSGLG 200 SGTMAAGGGA PMADNNEGAD GVGSSSGNWH CDSTWLGDRV ITTSTRTWAL 250 PTYNNHLYKQ ISNGTSGGST NDNTYFGYST PWGYFDNRF HCHFSPRDWQ 300 RLINNNWGFR PKRLNFKLFN IQVKEVTQNE GTKTIANNLT STIQVFTDSE 350 YQLPYVLGSA HQGCLPPFPA DVFMIPQYGY LTLNNGSQAV GRSSFYCLEY 400 FPSQMLRTGN NFEFSYQFED VPFHSSY AHS QSLDRLMNPL IDQYLYLSR 450 TQSTGGTAGT QQLLSQAGP NNMSAQAKNW LPGPCYRQQR VSTTILSQAAA 500

Название капсида	Вставка или замена	Аминокислотная последовательность
		SNFAWTGATK YHLNGRDSL V NPGVAMATHK DDEERFFPSS GVLMFGKQGA 550 GKDNVDYSSV MLTSEEEIK T TNPVATEQYG VVADNLQQQN AAPIVGAVNS 600 QGALPGMVWQ NRDVYLQGP I WAKIPHTDGN FHPSPLMGGF GLKHPPPQIL 650 IKNTPVPADP PTTFSQAKLA SFITQYSTGQ VSVEIEWELQ KENSKRWNP E 700 IQYTSNYYKS TNVDFAVNTD GTYSEPRPIG TRYLTRNL (SEQ ID NO:30)
AAV9.4 96NNN/ AAA498	498_NN N/ AAA_50 0	MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWALKPGAP QPKANQQHQD NARGLVLPGY KYLGPNGLD 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 LNNNWGFRP KRLNFKLFNI QVKEVTDNNG VKTIANNLTS TVQVFTDSY QLPYVLGSAH 360 EGCLPPFPAD VFMIPQYGYL TLNDGSQAVG RSSFYCLEYF PSQMLRTGNN FQFSYEFENV 420 PFHSSYAHSQ SLDRLMNPLI DQYLYYLSKT INSGQNQQT LKFSVAGPSN MAVQGRNYIP 480 GPSYRQQRVS TTVTQAAASE FAWPGASSWA LNGRNSLMNP GPAMASHKEG EDRFFPLSGS 540 LIFGKQGTGR DNVDADK VMI TNEEEIKTTN PVATESYGQV ATNHQSAQAQ AQTGWVQNQG 600 ILPGMVWQDR DVYLGPIWA KIPHTDGNFH PSPLMGGFGM KHPPPQILIK NTPVPADPPT 660 AFNKDKLNSF ITQYSTGQVS VEIEWELQKE NSKRWNPEIQ YTSNYYKSNN VEFAVNTEGV 720 YSEPRPIGTR YLTRNL (SEQ ID NO:31)
AAV9.4 96NNN/ AAA498 . W503R	496NNN / AAA498 , W503R	MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWALKPGAP QPKANQQHQD NARGLVLPGY KYLGPNGLD 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 LNNNWGFRP KRLNFKLFNI QVKEVTDNNG VKTIANNLTS TVQVFTDSY QLPYVLGSAH 360 EGCLPPFPAD VFMIPQYGYL TLNDGSQAVG RSSFYCLEYF PSQMLRTGNN FQFSYEFENV 420 PFHSSYAHSQ SLDRLMNPLI DQYLYYLSKT INSGQNQQT LKFSVAGPSN MAVQGRNYIP 480 GPSYRQQRVS TTVTQAAASE FARPGASSWA LNGRNSLMNP GPAMASHKEG EDRFFPLSGS 540 LIFGKQGTGR DNVDADK VMI TNEEEIKTTN PVATESYGQV ATNHQSAQAQ AQTGWVQNQG 600 ILPGMVWQDR DVYLGPIWA KIPHTDGNFH PSPLMGGFGM KHPPPQILIK NTPVPADPPT 660 AFNKDKLNSF ITQYSTGQVS VEIEWELQKE NSKRWNPEIQ YTSNYYKSNN VEFAVNTEGV 720 YSEPRPIGTR YLTRNL (SEQ ID NO:32)
AAV9 W503R	W503R	MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWALKPGAP QPKANQQHQD NARGLVLPGY KYLGPNGLD 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 LNNNWGFRP KRLNFKLFNI QVKEVTDNNG VKTIANNLTS TVQVFTDSY QLPYVLGSAH 360 EGCLPPFPAD VFMIPQYGYL TLNDGSQAVG RSSFYCLEYF PSQMLRTGNN FQFSYEFENV 420 PFHSSYAHSQ SLDRLMNPLI DQYLYYLSKT INSGQNQQT LKFSVAGPSN MAVQGRNYIP 480 GPSYRQQRVS TTVTQNNNSE FARPGASSWA LNGRNSLMNP GPAMASHKEG EDRFFPLSGS 540 LIFGKQGTGR DNVDADK VMI TNEEEIKTTN PVATESYGQV ATNHQSAQAQ AQTGWVQNQG 600 ILPGMVWQDR DVYLGPIWA KIPHTDGNFH PSPLMGGFGM KHPPPQILIK NTPVPADPPT 660 AFNKDKLNSF ITQYSTGQVS VEIEWELQKE NSKRWNPEIQ YTSNYYKSNN VEFAVNTEGV 720 YSEPRPIGTR YLTRNL (SEQ ID NO:33)
AAV9 Q474A	Q474A	MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWALKPGAP QPKANQQHQD NARGLVLPGY KYLGPNGLD 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

Название или капсида	Вставка или замена	Аминокислотная последовательность
		LINNNWGFRLP KRLNFKLFNI QVKEVTDNNG VKTIANNLTS TVQVFTDSY QLPYVLGSAH 360 EGCLPPFPAD VFMIPQYGYL TLNDGSQAVG RSSFYCLEYF PSQMLRTGNN FQFSYEFENV 420 PFHSSYAHSQ SLDRLMNPLI DQYLYYLSKT INGSQONQQT LKFSVAGPSN MAVAGRNYIP 480 GPSYRQQRVS TTVTQNNNSE FAWPGASSWA LNGRNSLMNP GPAMASHKEG EDRFFPLSGS 540 LIFGKQGTGR DNVDADKVI TNEEEKTTN PVATESYQV ATNHQSAQAQ AQTGWVQNG 600 ILPGMVWQDR DVYLGQPIWA KIPHTDGNFH PSPLMGGFGM KHPPPQILIK NTPVPADPPT 660 AFNKDKLNSF ITQYSTGQVS VEIEWELQKE NSKRWNPEIQ YTSNYYSNN VEFVNTTEGV 720 YSEPRPIGTR YLTRNL (SEQ ID NO:34)
AAV9 S454-D8	Кость1, DDDDD DDD (SEQ ID NO: 9) (454_45 5)	MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWALKPGAP QPKANQQHQD NARGLVLPY KYLPGNGLD 60 KGEPVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNPY LKYNHADA EF QERLKEDTSF GGNLGRAVFQ 120 AKKRLLEPLG LVEEAAKTAP GKKRPVEQSP QEPDSSAGIG KSGAQPAKLR LNFQGTGDTE 180 SVPDPQPIGE PPAAPSGVGS LTMASGGGAP VADNNEGADG VGSSSGNWHC DSQWLGDRI 240 TTSTRTWALP TYNNHLYKQI SNSTSGGSSN DNAYFGYSTP WGYDFNRFH CHFSRWDQR 300 LINNNWGFRLP KRLNFKLFNI QVKEVTDNNG VKTIANNLTS TVQVFTDSY QLPYVLGSAH 360 EGCLPPFPAD VFMIPQYGYL TLNDGSQAVG RSSFYCLEYF PSQMLRTGNN FQFSYEFENV 420 PFHSSYAHSQ SLDRLMNPLI DQYLYYLSKT INGSDDDDDD DDGQNQQT LKFSVAGPSNMAV481 QGRNYIPGPS YRQQRVSTTV TQNNNSEFAW PGASSWALNG RNSLMNPGPA MASHKEGEDR 541 FFPLSGSLIF GKQGTGRDNV DADKVMITNE EEIKTTNPVA TESYQVATN HQSAQAQAQT 601 GWVQNQGILP GMVWQDRDVY LQGPWAKIP HTDGNFHPSP LMGGFGMKHP PPQILIKNTP 661 VPADPPTAFN KDKLNSFITQ YSTGQVSVEI EWELQKENS K RWNPEIQYTS NYYSNNVEF 721 AVNTEGVYSE PRPIGTRYLT RNL (SEQ ID NO:35)
AAV9 S454- Мозг1	Мозг1, LSSRL DA (SEQ ID NO: 10) (454_45 5)	MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWALKPGAP QPKANQQHQD NARGLVLPY KYLPGNGLD 60 KGEPVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNPY LKYNHADA EF QERLKEDTSF GGNLGRAVFQ 120 AKKRLLEPLG LVEEAAKTAP GKKRPVEQSP QEPDSSAGIG KSGAQPAKLR LNFQGTGDTE 180 SVPDPQPIGE PPAAPSGVGS LTMASGGGAP VADNNEGADG VGSSSGNWHC DSQWLGDRI 240 TTSTRTWALP TYNNHLYKQI SNSTSGGSSN DNAYFGYSTP WGYDFNRFH CHFSRWDQR 300 LINNNWGFRLP KRLNFKLFNI QVKEVTDNNG VKTIANNLTS TVQVFTDSY QLPYVLGSAH 360 EGCLPPFPAD VFMIPQYGYL TLNDGSQAVG RSSFYCLEYF PSQMLRTGNN FQFSYEFENV 420 PFHSSYAHSQ SLDRLMNPLI DQYLYYLSKT INGSLSRRLD AGQNQQT LKFSVAGPSNMAV 480 QGRNYIPGPS YRQQRVSTTV TQNNNSEFAW PGASSWALNG RNSLMNPGPA MASHKEGEDR 540 FFPLSGSLIF GKQGTGRDNV DADKVMITNE EEIKTTNPVA TESYQVATN HQSAQAQAQT 600 GWVQNQGILP GMVWQDRDVY LQGPWAKIP HTDGNFHPSP LMGGFGMKHP PPQILIKNTP 660 VPADPPTAFN KDKLNSFITQ YSTGQVSVEI EWELQKENS K RWNPEIQYTS NYYSNNVEF 720 AVNTEGVYSE PRPIGTRYLT RNL (SEQ ID NO:36)
AAV9 S454- Мозг 2	Мозг2/ Мозг1С, CLSSRL DAC (SEQ ID NO: 11) (454_45 5)	MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWALKPGAP QPKANQQHQD NARGLVLPY KYLPGNGLD 60 KGEPVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNPY LKYNHADA EF QERLKEDTSF GGNLGRAVFQ 120 AKKRLLEPLG LVEEAAKTAP GKKRPVEQSP QEPDSSAGIG KSGAQPAKLR LNFQGTGDTE 180 SVPDPQPIGE PPAAPSGVGS LTMASGGGAP VADNNEGADG VGSSSGNWHC DSQWLGDRI 240 TTSTRTWALP TYNNHLYKQI SNSTSGGSSN DNAYFGYSTP WGYDFNRFH CHFSRWDQR 300 LINNNWGFRLP KRLNFKLFNI QVKEVTDNNG VKTIANNLTS TVQVFTDSY QLPYVLGSAH 360 EGCLPPFPAD VFMIPQYGYL TLNDGSQAVG RSSFYCLEYF PSQMLRTGNN FQFSYEFENV 420 PFHSSYAHSQ SLDRLMNPLI DQYLYYLSKT INGSCLSSRL DACGQNQQT LKFSVAGPSNMAV 482 QGRNYIPGPS YRQQRVSTTV TQNNNSEFAW PGASSWALNG RNSLMNPGPA MASHKEGEDR 542 FFPLSGSLIF GKQGTGRDNV DADKVMITNE EEIKTTNPVA TESYQVATN HQSAQAQAQT 602 GWVQNQGILP GMVWQDRDVY LQGPWAKIP HTDGNFHPSP LMGGFGMKHP PPQILIKNTP 662 VPADPPTAFN KDKLNSFITQ YSTGQVSVEI EWELQKENS K RWNPEIQYTS NYYSNNVEF 722 AVNTEGVYSE PRPIGTRYLT RNL (SEQ ID NO:37)
AAV9 S454-	Почки1, LPVAS	MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWALKPGAP QPKANQQHQD NARGLVLPY KYLPGNGLD 60 KGEPVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNPY LKYNHADA EF QERLKEDTSF GGNLGRAVFQ 120

Название с капсида	Вставка или замена	Аминокислотная последовательность
Почки1	(SEQ ID NO: 13) (454_455)	AKKRLLEPLG LVEEAAKTAP GKKRPVEQSP QEPDSSAGIG KSGAQPAKCR LNFQQTGDTE 180 SVPDPQPIGE PPAAPSGVGS LTMASGGGAP VADNNEGADG VGSSSGNWHC DSQWLGDRI 240 TTSTRTWALP TYNNHLYKQI SNSTSGGSSN DNAYFGYSTP WGYDFNRFH CHFSPRDWQR 300 LINNNWGFRP KRLNFKLFNI QVKEVTDNNG VKTIANNLTS TVQVFTDSY QLPYVLGSAH 360 EGCLPPFPAD VFMIPQYGYL TLNDGSQAVG RSSFYCLEYF PSQMLRTGNN FQFSYEFENV 420 PFHSSYAHSQ SLDRLMNPLI DQYLYLSKT INGLPVASG QNQQLKFSV AGPSNMAV 478 QGRNYIPGPS YRQQRVSTTV TQNNNSEFAW PGASSWALNG RNSLMNPGPA MASHKEGEDR 538 FFPLSGSLIF GKQGTGRDNV DADKVMITNE EEIKTNPVA TESYGQVATN HQSAQAQAQT 598 GWVQNQGILP GMVWQDRDVY LQGPIWAKIP HTDGNFHPSP LMGGFGMKHP PPQILIKNTP 658 VPADPPTAFN KDKLNSFITQ YSTGQVSVEI EWELQKENS RWNPEIQYTS NYKSNNEVF 718 AVNTEGVYSE PRPIGTRYLT RNL (SEQ ID NO:38)
AAV9 S454- Почки2	Почки2/ Почки1 C, CLPVA SC (SEQ ID NO: 12) (454_455)	MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWALKPGAP QPKANQQHQD NARGLVLPY KYLPGNGLD 60 KGEPVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNPY LKYNHADAEF QERLKEDTSF GGNLGRAVFQ 120 AKKRLLEPLG LVEEAAKTAP GKKRPVEQSP QEPDSSAGIG KSGAQPAKCR LNFQQTGDTE 180 SVPDPQPIGE PPAAPSGVGS LTMASGGGAP VADNNEGADG VGSSSGNWHC DSQWLGDRI 240 TTSTRTWALP TYNNHLYKQI SNSTSGGSSN DNAYFGYSTP WGYDFNRFH CHFSPRDWQR 300 LINNNWGFRP KRLNFKLFNI QVKEVTDNNG VKTIANNLTS TVQVFTDSY QLPYVLGSAH 360 EGCLPPFPAD VFMIPQYGYL TLNDGSQAVG RSSFYCLEYF PSQMLRTGNN FQFSYEFENV 420 PFHSSYAHSQ SLDRLMNPLI DQYLYLSKT INGLPVAS CGQNQQLKF SVAGPSNMAV 480 QGRNYIPGPS YRQQRVSTTV TQNNNSEFAW PGASSWALNG RNSLMNPGPA MASHKEGEDR 540 FFPLSGSLIF GKQGTGRDNV DADKVMITNE EEIKTNPVA TESYGQVATN HQSAQAQAQT 600 GWVQNQGILP GMVWQDRDVY LQGPIWAKIP HTDGNFHPSP LMGGFGMKHP PPQILIKNTP 660 VPADPPTAFN KDKLNSFITQ YSTGQVSVEI EWELQKENS RWNPEIQYTS NYKSNNEVF 720 AVNTEGVYSE PRPIGTRYLT RNL (SEQ ID NO:39)
AAV9 S454- Мышца 1	Мышца 1, ASSLNI A (SEQ ID NO: 14) (454_455)	MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWALKPGAP QPKANQQHQD NARGLVLPY KYLPGNGLD 60 KGEPVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNPY LKYNHADAEF QERLKEDTSF GGNLGRAVFQ 120 AKKRLLEPLG LVEEAAKTAP GKKRPVEQSP QEPDSSAGIG KSGAQPAKCR LNFQQTGDTE 180 SVPDPQPIGE PPAAPSGVGS LTMASGGGAP VADNNEGADG VGSSSGNWHC DSQWLGDRI 240 TTSTRTWALP TYNNHLYKQI SNSTSGGSSN DNAYFGYSTP WGYDFNRFH CHFSPRDWQR 300 LINNNWGFRP KRLNFKLFNI QVKEVTDNNG VKTIANNLTS TVQVFTDSY QLPYVLGSAH 360 EGCLPPFPAD VFMIPQYGYL TLNDGSQAVG RSSFYCLEYF PSQMLRTGNN FQFSYEFENV 420 PFHSSYAHSQ SLDRLMNPLI DQYLYLSKT INGLPVAS AGQNQQLKF SVAGPSNMAV 480 QGRNYIPGPS YRQQRVSTTV TQNNNSEFAW PGASSWALNG RNSLMNPGPA MASHKEGEDR 540 FFPLSGSLIF GKQGTGRDNV DADKVMITNE EEIKTNPVA TESYGQVATN HQSAQAQAQT 600 GWVQNQGILP GMVWQDRDVY LQGPIWAKIP HTDGNFHPSP LMGGFGMKHP PPQILIKNTP 660 VPADPPTAFN KDKLNSFITQ YSTGQVSVEI EWELQKENS RWNPEIQYTS NYKSNNEVF 720 AVNTEGVYSE PRPIGTRYLT RNL (SEQ ID NO:40)
AAV9 S454- Tfr1	Tfr1, HAIYP R (SEQ ID NO: 59) (454_455)	MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWALKPGAP QPKANQQHQD NARGLVLPY KYLPGNGLD 60 KGEPVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNPY LKYNHADAEF QERLKEDTSF GGNLGRAVFQ 120 AKKRLLEPLG LVEEAAKTAP GKKRPVEQSP QEPDSSAGIG KSGAQPAKCR LNFQQTGDTE 180 SVPDPQPIGE PPAAPSGVGS LTMASGGGAP VADNNEGADG VGSSSGNWHC DSQWLGDRI 240 TTSTRTWALP TYNNHLYKQI SNSTSGGSSN DNAYFGYSTP WGYDFNRFH CHFSPRDWQR 300 LINNNWGFRP KRLNFKLFNI QVKEVTDNNG VKTIANNLTS TVQVFTDSY QLPYVLGSAH 360 EGCLPPFPAD VFMIPQYGYL TLNDGSQAVG RSSFYCLEYF PSQMLRTGNN FQFSYEFENV 420 PFHSSYAHSQ SLDRLMNPLI DQYLYLSKT INGLPVAS HAIYPR HGQNQQLKF SVAGPSNMAV 480 QGRNYIPGPS YRQQRVSTTV TQNNNSEFAW PGASSWALNG RNSLMNPGPA MASHKEGEDR 540 FFPLSGSLIF GKQGTGRDNV DADKVMITNE EEIKTNPVA TESYGQVATN HQSAQAQAQT 600 GWVQNQGILP GMVWQDRDVY LQGPIWAKIP HTDGNFHPSP LMGGFGMKHP PPQILIKNTP 660 VPADPPTAFN KDKLNSFITQ YSTGQVSVEI EWELQKENS RWNPEIQYTS NYKSNNEVF 720

Название капсида	Вставка или замена	Аминокислотная последовательность
		AVNTEGVYSE PRPIGTRYLT RNL (SEQ ID NO:41)
AAV9 S454- Tfr3	Tfr3, RTIGPS V (SEQ ID NO: 19) (454_45 5)	MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWALKPGAP QPKANQQHQD NARGLVLPGY KYLGPNGGLD 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 CHFSRPDWQR 300 LINNNWGFRP KRLNFKLFNI QVKEVTDNNG VKTIANNLTS TVQVFTDSY QLPYVLGSAH 360 EGCLPPFPAD VFMIPQYGYL TLNDGSQAVG RSSFYCLEYF PSQMLRTGNN FQFSYEFENV 420 PFHSSYAHSQ 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 VPADPPTAFN KDKLNSFITQ YSTGQVSVEI EWELQKENS K RWNPEIQYTS NYKSNVVEF 720 AVNTEGVYSE PRPIGTRYLT RNL (SEQ ID NO:42)
AAV9 S454- Tfr4 (AAV9 S454- TFR3C)	Tfr4, CRTIGP SVC (SEQ ID NO: 20) (454_45 5)	MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWALKPGAP QPKANQQHQD NARGLVLPGY KYLGPNGGLD 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 CHFSRPDWQR 300 LINNNWGFRP KRLNFKLFNI QVKEVTDNNG VKTIANNLTS TVQVFTDSY QLPYVLGSAH 360 EGCLPPFPAD VFMIPQYGYL TLNDGSQAVG RSSFYCLEYF PSQMLRTGNN FQFSYEFENV 420 PFHSSYAHSQ SLDRLMNPLI DQYLYLSKT INGSRTIGP SVCQGNQQTL KFSVAGPSNMAV 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 NYKSNVVEF 722 AVNTEGVYSE PRPIGTRYLT RNL (SEQ ID NO:43)
AAV9.5 88Ad (9 588 Ad)	SITLVK STQTV (SEQ ID NO: 21), DLC- AS1 (588_58 9)	MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWALKPGAP QPKANQQHQD NARGLVLPGY KYLGPNGGLD 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 CHFSRPDWQR 300 LINNNWGFRP KRLNFKLFNI QVKEVTDNNG VKTIANNLTS TVQVFTDSY QLPYVLGSAH 360 EGCLPPFPAD VFMIPQYGYL TLNDGSQAVG RSSFYCLEYF PSQMLRTGNN FQFSYEFENV 420 PFHSSYAHSQ SLDRLMNPLI DQYLYLSKT INGSQGNQQT LKFSVAGPSN MAVQGRNYIP 480 GPSYRQQRVS TTVTQNNNSI TLVKSTQTVS EFAWPGASSW ALNGRNSLMN PGPAMASHKE 540 GEDRFFPLSG SLIFGKQGTG RDNVDADKVM ITNEEEIKTT NPVATESYGO VATNHQSAQA 600 QAQTGWVQNNQ GILPGMVWQD RDVYLQGPW AKIPHTDGNF HPSPLMGGFG MKHPPPQILI 660 KNTPVPADPP TAFNKDKLNS FITQYSTGQV SVEIEWELQK ENSKRWNPEI QYTSNYKSN 720 NVEFAVNTEG VYSEPRPIGT RYLTRNL (SEQ ID NO:44)
AAV9.5 88 Hep (9 588 Hep)	TILSRS TQTG (SEQ ID NO: 22), DLC- AS2, 588_589	MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWALKPGAP QPKANQQHQD NARGLVLPGY KYLGPNGGLD 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 CHFSRPDWQR 300 LINNNWGFRP KRLNFKLFNI QVKEVTDNNG VKTIANNLTS TVQVFTDSY QLPYVLGSAH 360 EGCLPPFPAD VFMIPQYGYL TLNDGSQAVG RSSFYCLEYF PSQMLRTGNN FQFSYEFENV 420 PFHSSYAHSQ SLDRLMNPLI DQYLYLSKT INGSQGNQQT LKFSVAGPSN MAVQGRNYIP 480 GPSYRQQRVS TTVTQNNNTI LSRSTQTGSE FAWPGASSWA LNNGRNSLMNP GPAMASHKEG 540

Название или капсида	Вставка или замена	Аминокислотная последовательность
		EDRFFPLSGS LIFGKQGTGR DNVDADK VMI TNEEEIKTTN PVATESYGQV ATNHQSAQAQ 600 AQTGWVQNQG ILPGMVWQDR DVYLQGIWA KIPHTDGNFH PSPLMGGFGM KHPPQILIK 660 NTPVPADPPT AFNKDKLNSF ITQYSTGQVS VEIEWELQKE NSKRWNPEIQ YTSNYYKSNN 720 VEFAVNTEG VYSEPRPIGT RYLTRNL (SEQ ID NO:45)
AAVPH PeB.VP 2Ad	SITLVK STQTV (SEQ ID NO: 21), DLC- AS1 (138_13 9)	1 MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWALKPGAP QPKANQQHQD NARGLVLPGY KYLGPGNGLD 61 KGEPVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNPY LKYNHADA EF QERLKEDTSF GGNLGRAVFQ 121 AKKRLEPLG LVEEAAKTTI LSRSTQTGAP GKKRPVEQSP QEPDSSAGIG KSGAQPAKKR LNFGQTGDTE 191 SVPDPQPIGE PPAAPSGVGS LTMASGGGAP VADNNEGADG VGSSSGNWHC DSQWLGD RVI 251 TTSTRTWALP TYNHLYKQI SNSTSGGSSN DNAYFGYSTP WGYDFNRFH CHFSPRDWQR 311 LINNNWGRFP KRLNFKLFNI QVKEVTDNNG VKTIANNLTS TVQVFTDSY QLPYVLGSAH 371 EGCLPPFPAD VMIPQYGYL TLNDGSQAVG RSSFYCLEYF PSQMLRTGNN FQFSYEFENV 431 PFHSSY AHSQ SLDRLMNPLI DQYLYLSRT INSGSQNQQT LKFSVAGPSN MAVQGRNYIP 491 GPSYRQQRVS TTVTQNNNSE FAWPGASSWA LNGRNSLMNP GPAMASHKEG EDRFFPLSGS 551 LIFGKQGTGR DNVDADK VMI TNEEEIKTTN PVATESYGQV ATNHQSDGTL AVPFKAQAQT 611 GWVQNQGILP GMVWQDRDVY LQGPIWAKIP HTDGNFHPS LMGGFGMKHP PPQILIKNTP 671 VPADPPTAFN KDKLNSFITQ YSTGQVSVEI EWELQKENS K RWNPEIQYTS NYYKSNNVEF 731 AVNTEGVYSE PRPIGTRYLT RNL (SEQ ID NO:46)
AAVPH PeB.VP 2Herp	TILSRS TQTG (SEQ ID NO: 22), DLC- AS2, (138_13 9)	1 MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWALKPGAP QPKANQQHQD NARGLVLPGY KYLGPGNGLD 61 KGEPVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNPY LKYNHADA EF QERLKEDTSF GGNLGRAVFQ 121 AKKRLEPLG LVEEAAKTSI TLVKSTQTV A PGKKRPVEQS PQEPDSSAGI GKSGAQPAKK RLNFGQTGDTE 192 SVPDPQPIGE PPAAPSGVGS LTMASGGGAP VADNNEGADG VGSSSGNWHC DSQWLGD RVI 252 TTSTRTWALP TYNHLYKQI SNSTSGGSSN DNAYFGYSTP WGYDFNRFH CHFSPRDWQR 312 LINNNWGRFP KRLNFKLFNI QVKEVTDNNG VKTIANNLTS TVQVFTDSY QLPYVLGSAH 372 EGCLPPFPAD VMIPQYGYL TLNDGSQAVG RSSFYCLEYF PSQMLRTGNN FQFSYEFENV 432 PFHSSY AHSQ SLDRLMNPLI DQYLYLSRT INSGSQNQQT LKFSVAGPSN MAVQGRNYIP 492 GPSYRQQRVS TTVTQNNNSE FAWPGASSWA LNGRNSLMNP GPAMASHKEG EDRFFPLSGS 552 LIFGKQGTGR DNVDADK VMI TNEEEIKTTN PVATESYGQV ATNHQSDGTL AVPFKAQAQT 612 GWVQNQGILP GMVWQDRDVY LQGPIWAKIP HTDGNFHPS LMGGFGMKHP PPQILIKNTP 672 VPADPPTAFN KDKLNSFITQ YSTGQVSVEI EWELQKENS K RWNPEIQYTS NYYKSNNVEF 732 AVNTEGVYSE PRPIGTRYLT RNL (SEQ ID NO:47)
rh34	-	MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYEYLGPFNGLDKGEPVNAA DAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADA EFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVL EPLGLVEEGAK TAPGKKRPLESPQEPDSSSGIGKKGKQPAKKRLNFEEDTGAGDGPPEGSDTSAMSSDIEMRAAPGGNAVDA GQGS DGVGNASGDWHCDSTWSEGKVT TTTSTRTWLVLP TYNHLYLRLGTTSNSTYNGFSTPWGYFDN RFHCHFSPRDWQRLINNNWGLRPKAMRVKIFNIQVKEVTTSNGETTVANL TSTVQIFADSSYELPYVMDA GQEGSLPPFPNDVMVPQYGYCGIVTGENQNQTD RNAFYCLEYFPSQMLRTGNNFETAYNFEKVPFHSMY AHSQSLDGLMNPLLDQYLWHLQSTTSGETLNQGNAATTFGKIRSGDFAFYRKNWLP GPVCVKQRFSKTAS QNYKIPASGGNALLKYDTHYTLNRRWSNIAPGPPMATAGPSDGD FSNACLIFPGPSVTGNTTTSANLLFTS EEEIAATNPRD TDMFGQIADNNQNA T TAPITGNVTAMGVLPGMVWQNRDIYYQGP I WAKIPHADGHFHPSP LIGGFGLKHPPPIFIKNTPVPAYPATTF TAARVDSFITQYSTGQVAVQIEWEIEKERSKRWNPEVQFTSNCG NQSSMLWAPD TTGKYTEPRVIGSRYL TNHL (SEQ ID NO:82)
hu.31	-	MAADGYLPDW LEDTLSEGIR QWWKLKPGPP PPKPAERHKD DSRGLVLPGY KYLGPNGLD KGEPVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNPY LKYNHADA EF QERLKEDTSF GGNLGRAVFQ AKKRLEPLG LVEEAAKTAP GKKRPVEQSP QEPDSSAGIG KSGSQPAKKK LNFGQTGDTE SVPDPQPIGE PPAAPSGVGS

Названи е капсида	Вставка или замена	Аминокислотная последовательность
		<p>LTMASGGGAP VADNNEGADG VGSSSGNWHC DSQWLGDRVI TTSTRTWALP TYNNHLYKQI SNSTSGGSSN DNAYFGYSTP WGYDFNRFH CHFSPRDWQR LINNNWGFRRP KRLNFKLFNI QVKEVTDNNG VKTIANNLTS TVQVFTDSDY QLPYVLGSAH EGCLPPFPAD VMIPQYGYL TLNDGGQAVG RSSFYCLEYF PSQMLRTGNN FQFSYEFENV PFHSSY AHSQ SLDRLMNPLI DQYLYYLSKT INGSGQNQQT LKFSVAGPSN MAVQGRNYIP GPSYRQQRVS TTVTQNNNSE FAWPGASSWA LNGRNSLMNP GPAMASHKEG EDRFFPLSGS LIFGKQGTGR DNVDADK VMI TNEEEIKTTN PVATESYGQV ATNHQSAQAQ AQTGWVQNQG ILPGMVWQDR DVYLQGPIWA KIPHTDGNFH PSPLMGGFGM KHPPPQILIK NTPVPADPPT AFNKDKLNSF ITQYSTGQVS VEIEWELQKE NSKRWNPEIQ YTSNYKSN VEFVSTEGV YSEPRPIGTR YLTRNL (SEQ ID NO:83)</p>
rh.31	-	<p>KAYDQQLKAG DNPYLRYNHA DAEFQERLQE DTSFGGNLGR AVFQAKKRVL EPLGLVETPA KTAPGKKRPV DSPDSTSGIG KKGQPAKRR LNFQGTGDSE SVPDPQPIGE PPAGPSGLGS GTMAAGGGAP MADNNEGADG VGNASGNWHC DSTWL GDRVI TTSTRTWALP TYNNHLYKQI SSQSAGSTND NVYFGYSTPW GYDFNRFHC HFSPRDWQRL INNNWGFRRP KLNFKLFNIQ VKEVTTNDGV TTIANNLTST VQVSDSEYQ LPYVLGSAHQ GCLPPFPADV FMIPQYGYLT LNNGSQSVGR SSFYCLEYFP SQMLRTGNNF TFSYTFEDVP FHSSY AHSQS LDRLMNPLID QYLYYLARTQ SNAGGTAGNR ELQFYQGGPT TMAEQAKNWL PGPCFRQQRV SKTLDQNNNS NFAWTGATKY HLNXRNSL VN PGVAMATHKD DEERFFPSSG VLIFGKTGAA NKTTLENVLM TNEEIRPTN PVATEEYGIV SSNLQAATA AQTQVVNNQG ALPGMVWQNR DVYLQGPIWA KIPHTDGNFH PSPLMGGFGL KHPPPQILIK NTPVPANPPE VFTPAKFAF ITQYSTGQVS VEIEWELQKE NSKRWNPEIQ YTSNFDKQTG VDFAVDSQGV YSEP (SEQ ID NO:84)</p>
hu.12	-	<p>MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLPKPPPKPAERHQDDSRGLVLPGYK YLGPFGNDL KGEVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLYNHADA E FQERLKEDTSFGGNLGRAVFG AKKRVLEPLGLVEEPVK TAPGKKRPVEHSPVEPDSSSGTGKAGHQPARKRLNFGQTDAD SVPDPQPLGQPPAAPTSLGSTMATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSQWL GDRVI TTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYDFNRFHCHFSPRDWQRLI NNNWGFRRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQG CLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRPSFYCLEYFSPQMLRTGNNFTFSYTFEDVPF HSSY AHSQSLDRLMNPLIDQYL YLNRQTQNSGTLQQSRLLSQAGPTSMQLAKNWLPG PCYRQQRVSKQANDNNNSNFPWTAATKYHLNGRDSL VNP GPAMASHKDDEEKFFPMHGTL IFGKQGTNANDADLEHVMITDEEIRTNPVATEYQGNVSNLQNSNTGPTENVNHQGA LPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPMLMGGFGLKHPPPQIMIKNTPVPANPTN FSSAKFAFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYKSVNVDFTVDTNGVY SEPRPIGTRYLTRNL (SEQ ID NO:85)</p>
hu.13	-	<p>MAADGYLPDW LEDTLSEGIR QWWKLPKPPP PPKPAERHKD DSRGLVLPGY KYLGPFGNDL KGEVNEADA AALEHDKAYD RQLDSGDNPY LKYNHADA E F QERLKEDTSF GGNLGRAVFG AKKRVLEPLGLVEEPVK TAP GKKRPVEHSP AEPDSSSGTG KAGQPARKR LNFQGTGDAD SVPDPQPLGQ PPAAPSGLGT NTMASGSGAP MADNNEGADG VGNSSGNWHC DSTWMGDRVI TTSTRTWALP TYNNHLYKQI SSQSGASNDN HYFGYSTPWG YDFNRFHCHFSPRDWQRLI NNNWGFRRPKR LNFKLFNIQV KEVTQNDGTTIANNLTSTV QVFTDSEYQL PYVLGSAHQG CLPPFPADV FMVPQYGYLTL NNGSQAVGRS SFYCLEYFSP QMLRTGNNFT FSYTFEDVPF HSSY AHSQSL DRLMNPLIDQ YLYYLSRTNT PSGTTTQSR LQFSQAGASDI RDQSRNWLPG PCYRQQRVSK TSADNNNSEY SWTGATKYHL NGRDSL VNP GPAMASHKDDE EKFFPQSGVL IFGKQSEKT NVDIEKVMIT DEEIRTNP VATEYQGSVS TNLQGGNTQA ATADVNTQGV</p>

Название капсида	Вставка или замена	Аминокислотная последовательность
		LPGMVWQDRD VYLQGPWAK IPHTDGHFHP SPLMGGFGLK HPPPQILIKN TPVPANPSTT FSAAKFASFI TQYSTGQVSV EIEWELQKEN SKRWNPEIQY TSNYNKSVMV DFTVDTNGVY SEPRPIGTRY LTRNL (SEQ ID NO:85)
hu.21	-	MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLPKPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEPVNEAD AAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRILEPLGLVEEPVKTA PGKKRPVEHSPAEPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDADSVDPRLGQPPAAPSGLGTNTMASGSGAP MADNNEGADGVGNSSGNWHCSTWVGDRVITSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPW GYFDNRFHCHFSRPDWQRLINNNWGFPRKLSFKLFNIQVKEVTQNDGTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLP YVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVFPFHS SYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLRTNTPSGTTTMSRLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTAA DNNNSDYSWGATKYHLNGRDSL VNP GPAMASHKDDEEK YFPQSGVLIFGKQDSGKT NVDIEK VMITDDEE EIRTNTNPVATEQYGSVSTNLQSGNTQAATSDVNTQGVLPGMVWQDRDVYLQGPWAKIPHTDGHFHP SPL MGGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSV EIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYNK SVNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL (SEQ ID NO:74)
hu.26	-	MAADGYLPDW LEDTLSEGIR QWWKLPKPPP PPKPAERHKD DSRGLVLPGY KYLGPFNGLD KGEPVNEADA AALEHDKAYD RQLDSGDNPY LKYNHADADEF QERLKEDTSF GGNLGRAVFQ AKKRILEPLG LVEEPVKTAP GKKRPVEHSP AEPDSSSGTG KAGQQPARKR LNFGQTGDAD SVPDPQLGQ PPAAPSGLGT NTMASGSGAP MADNNEGADG VGNSSGNWHC DSTWVGDRVI TTSTRTWALP TYNHLYKQI SSQSGASNDN HYFGYSTPWG YFDNRFHCH FSPRDWQRLI NNNWGFPRKR LSFKLFNIQV KEVTQNDGTT TIANNLTSTV QVFTDSEYQL PYVLGSAHQG CLPPFPADV FMVPQYGYLTL NNGSQAVGRS SFYCLEYFPS QMLRTGNNFT FSYTFEDVPF HSSY AHSQSL DRLMNPLIDQ YLYLRTNT PSGTTTMSRL QFSQAGASDI RDQSRNWLPG PCYRQQRVSK TAADNNSDY SWGATKYHL NGRDSL VNP GPAMASHKDDEE EKYFPQSGVL IFGKQDSGKT NVDIEK VMIT DEEEIRTNTNP VATEQYGSVS TNLQSGNTQA ATSDVNTQGV LPGMVWQDRD VYLQGPWAK IPHTDGHFHP SPLMGGFGLK HPPPQILIKN TPVPANPSTT FSAAKFASFI TQYSTGQVSV EIEWELQKEN SKRWNPEIQY TSNYNKSVMV DFTVDTNGVY SEPRPIGTRY LTRNL (SEQ ID NO:76)
hu.53	-	MAADGYLPDW LEDTLSEGIR QWWKLPKPPP PPKPAERHKD DSRGLVLPGY KYLGPFNGLD KGEPVNEADA AALEHDKAYD RQLDSGDNPY LKYNHADADEF QERLKEDTSF GGNLGRAVFQ AKKRILEPLG LVEEPVKTAP GKKRPVEHSP AEPDSSSGTG KAGQQPARKR LNFGQTGDAD SVPDPQLRQ PPAAPSLGS TTMATGSGAP MADNNEGADG VGNSSGNWHC DSQWLGDRVI TTSTRTWALP TYNNHLYKQI SSQSGASNDN HYFGYSTPWG YFDNRFHCH FSPRDWQRLI NNNWGFPRKR LNFKLFNIQV KEVTQNDGTT TIANNLTSTV QVFTDSEYQL PYVLGSAHQG CLPPFPADV FMVPQYGYLTL NNGSQAVGRS SFYCLEYFPS QMLRTGNNFQ FSYTFEDVPF HSSY AHSQSL DRLMNPLIDQ YLYLNRQT ASGTQSRLL FSQAGPTSMS LQAKNWLPGP CYRQQLSKQ ANDNNSNFP WTGATKYLYN GRDSL VNP GPAMASHKDDEE KFFPMHGTLI FGKEGTNATN AELENVMITD EEEIRTNTNPV ATEQYGYVSN NLQNSNTAAS TETVNHQ GAL PGMVWQDRDV YLQGPWAKI PHTDGHFHP SPLMGGFGLKH PPPQIMIKNT PVPANPPTNF SSAKFASFIT QYSTGQVSV EIEWELQKENS KRWNPEIQY SNYNKSVMV DFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL (SEQ ID NO:77)
hu.56	-	MAADGYLPDW LEDTLSEGIR QWWKLPKPPP PPKPAERHKD DSRGLVLPGY KYLGPFNGLD KGEPVNEADA AALEHDKAYD RQLDSGDNPY LKYNHADADEF QERLKEDTSF GGNLGRAVFQ AKKRILEPLG LVEEPVKTAP GKKRPVEHSP VEPDSSSGTG KAGNQPARKR LNFGQTGDAD SVPDPQLGQ PPASPSGLGT NTMATGSGAP MADNNEGADG VGNSSGNWHC DSTWVGDRVV TTSTRTWALP TYNNHLYKQI SSQSGASNDN HYFGYSTPWG YFDNRFHCH FSPRDWQRLI NNNWGFPRKR LNFKLFNIQV KEVTQNDGTT TIANNLTSTV QVFTDLEYQL

Название капсида	Вставка или замена	Аминокислотная последовательность
		PYVLGSAHQG CLPPFPADVF MVPQYGYLTL NNGSQAVGRS SFYCLEYFPS QMLRTGNNFT FSYTFEDVPF HSSYAHSQSL DRLMNPLIDQ YLYLSRTNT PSGTTTQSRL QFSQAGASDI RDQSRNWLPG PCYRQQRVSK TAADNNNSEY SWTGATKYHL NGRDSL VNPG PAMASHKDDE EKFFPQSGVL IFGKQGSEKT NVDIEKVMIT DEEEIRTTNP VATEQYGSVS TNLQSGNTQA ATSDVNTQGV LPGMVWQDRD VYLQGPWAK IPHTDGHFHP SPLMGGFGLK HPPPQILIKN TPVPANPSTT FSAAKFASFI TQYSTGQVSV EIEWELQKEN SKRWNPEIQY TSNYNKSNNV DFTVDTNGVY SEPRPIGTRY LTRNL (SEQ ID NO:86)
Rh.64R1	R697W	MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWDLKPGAP KPKANQQKD DGRGLVLPGY KYLGPNGLD KGEPVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNPY LRYNHADA EF QERLQEDTSF GGNLGRAVFQ AKKRVLLEPLG LVEEAKTAP GKKRPVEPSP QRSPDSTGI GKKGQQPARK RLNFQGTGDS ESVPDPQPIG EPPAAPSSVG SGTMAAGGGA PMADNNEGAD GVGSSSGNWH CDSTWLGDRV ITTSTRTWAL PTYNNHL YKQ ISNGTSGGST NDNTYFGYST PWGYDFNRF HCHFSPRDWQ RLINNNWGFR PKRLSFKLFN IQVKEVTQNE GTKTIANNLT STIQVFTDSE YQLPYVLGSA HQGCLPPFPA DVMIPQYGY LTLNNGSQAV GRSSFYCLEY FPSQMLRTGN NFSFSYTFED VPFHSSYAHS QSLDRLMNPL IDQYL YLSR TQSTGGTAGT QQLFSQAGP SNMSAQARNW LPGPCYRQQR VSTILSQNNN SNFAWTGATK YHLNGRDSL V NPGVAMATNK DDEDRFFPSS GILMFQKQGA GKDNVDYSNV MLTSEEEIKT TNPVATEQYG VVADNLQQN TAPIVGAVNS QGALPGMVWQ NRDVYLQGP WAKIPHTDGN FHPSPLMGGF GLKHPPPQIL IKNTPVPADP PTA FNQAKLN SFITQYSTGQ VSVEIWELQ KENSKRWNPE (SEQ ID NO:90)
AAV9.N 272A.49 6NNN/A AA498	N272A 498_NN N/ AAA_50 0	MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWALKPGAP QPKANQQHQD NARGLVLPGY KYLGPNGLD 60 KGEPVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNPY LKYNHADA EF QERLKEDTSF GGNLGRAVFQ 120 AKKRLEPLG LVEEAAKTAP GKKRPVEQSP QEPDSSAGIG KSGAQPAKKR LNFQGTGDTE 180 SVPDPQPIGE PPAAPSGVGS LTMASGGGAP VADNNEGADG VGSSSGNWHC DSQWLGDVI 240 TTSTRTWALP TYNNHLYKQI SNSTSGGSSN DAA YFGYSTP WGYDFNRFH CHFSPRDWQR 300 LINNNWGFRP KRLNFKLFNI QVKEVTDNNG VKTIANNLTS TVQVFTDSY QLPYVLGSAH 360 EGCLPPFPAD VFMIPQYGYL TLNDGSQAVG RSSFYCLEYF PSQMLRTGNN FQFSYEFENV 420 PFHSSYAHSQ SLDRLMNPLI DQYL YLSKT INGSQONQQT LKFSVAGPSN MAVQGRNYIP 480 GPSYRQQRVS TTVTQAAASE FAWPGASSWA LNGRNSLMNP GPAMASHKEG EDRFFPLSGS 540 LIFGKQGTGR DNVDADK VMI TNEEEIKTTN PVATESYGQV ATNHQSAQAQ AQTGWVQNGQ 600 ILPGMVWQDR DVYLQGPWA KIPHTDGNFH PSPLMGGFGM KHPPPQILIK NTPVPADPPT 660 AFNKDKLNSF ITQYSTGQVS VEIEWELQKE NSKRWNPEIQ YTSNYKSN VEFVNTTEGV 720 YSEPRPIGTR YLTRNL (SEQ ID NO:91)
AAV9.G 266A.49 6NNN/A AA498	G266A 498_NN N/ AAA_50 0	MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWALKPGAP QPKANQQHQD NARGLVLPGY KYLGPNGLD 60 KGEPVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNPY LKYNHADA EF QERLKEDTSF GGNLGRAVFQ 120 AKKRLEPLG LVEEAAKTAP GKKRPVEQSP QEPDSSAGIG KSGAQPAKKR LNFQGTGDTE 180 SVPDPQPIGE PPAAPSGVGS LTMASGGGAP VADNNEGADG VGSSSGNWHC DSQWLGDVI 240 TTSTRTWALP TYNNHLYKQI SNSTAGSSN DNA YFGYSTP WGYDFNRFH CHFSPRDWQR 300 LINNNWGFRP KRLNFKLFNI QVKEVTDNNG VKTIANNLTS TVQVFTDSY QLPYVLGSAH 360 EGCLPPFPAD VFMIPQYGYL TLNDGSQAVG RSSFYCLEYF PSQMLRTGNN FQFSYEFENV 420 PFHSSYAHSQ SLDRLMNPLI DQYL YLSKT INGSQONQQT LKFSVAGPSN MAVQGRNYIP 480 GPSYRQQRVS TTVTQAAASE FAWPGASSWA LNGRNSLMNP GPAMASHKEG EDRFFPLSGS 540 LIFGKQGTGR DNVDADK VMI TNEEEIKTTN PVATESYGQV ATNHQSAQAQ AQTGWVQNGQ 600 ILPGMVWQDR DVYLQGPWA KIPHTDGNFH PSPLMGGFGM KHPPPQILIK NTPVPADPPT 660 AFNKDKLNSF ITQYSTGQVS VEIEWELQKE NSKRWNPEIQ YTSNYKSN VEFVNTTEGV 720 YSEPRPIGTR YLTRNL (SEQ ID NO:92)
Rh.46		MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPNGLD

Название капсида	Вставка или замена	Аминокислотная последовательность
		KGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQ AKKRVLLEPLGLVEEAKTAPGKKRPVEPSPQRSPTSSTGIGKKGQQPARKRLNFGQTGDS ESVPDPPIGEPPAAPSSVSGTMAAGGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGDRV ITTSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGSTNDNTYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSRPDWQ RLINNNWGFPRKRLSFKLFNIQVKEVTQNEGTKTIANNLTSTIQVFTDSEYQLPYVLGSA HQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFYSYTFED VPFHSSYAHSQLDRLMNPLIDQYLYLSRTQSTGGTAGTQQLLFSQAGPSNMSAQARNW LPGPCYRQQRVSTTLSQNNNSNFAWTGATKYHLNGRDSL VNPGVAMATNKDDEDREFFPSS GILMFGKQGAGKDNVDYSNVMLTSEEIKATNPVATEQYGVVADNLQQNTAPIVGAVNS QGALPGMVWQNRDVYLGQPIWAKIPHDTDGNFHPSPMLGGFGLKHPPPQILIKNTPVPADP PTAFNQAKLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYKSTNVDFAVNTE GYSEPRPIGTRYLTRNL (SEQ ID NO:93)

7. Эквиваленты

[00284] Хотя изобретение подробно описано со ссылкой на его конкретные варианты осуществления, следует понимать, что варианты, которые функционально эквивалентны, входят в объем данного изобретения. Действительно, различные модификации изобретения в дополнение к тем, которые показаны и описаны в данном документе, станут очевидными для специалистов в данной области техники из вышеприведенного описания и прилагаемых графических материалов. Предполагается, что такие модификации входят в объем прилагаемой формулы изобретения. Специалисты в данной области распознают или смогут установить, используя не более чем обычные эксперименты, многие эквиваленты конкретных вариантов осуществления изобретения, описанных в данном документе. Предполагается, что такие эквиваленты охватываются следующей формулой изобретения.

[00285] 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 как включенные в данное описание посредством ссылки в полном объеме.

[00286] Приведенное в данном документе обсуждение обеспечивает лучшее понимание природы проблем, стоящих перед данной областью техники, и никоим образом не должно толковаться как допущение относительно предшествующего уровня техники, а цитирование какого-либо источника в данном документе не должно толковаться как признание того, что такой источник представляет собой «предшествующий уровень техники» данной заявки.

[00287] Все источники, включая патентные заявки и публикации, цитируемые в данном документе, включены в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме и для

всех целей в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация или патент, или патентная заявка были специально и отдельно указаны как включенные посредством ссылки в полном объеме для всех целей. Многие модификации и вариации этого изобретения могут быть сделаны без отклонения от его сущности и объема, что будет очевидно специалистам в данной области техники. Конкретные варианты осуществления, описанные в данном документе, предложены только в качестве примера, и изобретение должно быть ограничено только условиями прилагаемой формулы изобретения вместе с полным объемом эквивалентов, на которые распространяется такая формула изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекомбинантный капсидный белок AAV, содержащий одну или несколько аминокислотных замен по сравнению с капсидным белком дикого типа или несконструированным капсидным белком, причем капсидный белок гAAV представляет собой капсидный белок AAV9 (SEQ ID NO:67) с заменами S263G/S269R/A273T, заменой G266A, заменой N272A, заменой W503R, заменой Q474A, заменами 496-NNN/AAA-498, имеет вставку пептида TLAAPFK (SEQ ID NO:1) между Q588 и A589, S268 и S269 или S454 и G455, или представляет собой капсид AAV8 (SEQ ID NO:6) с заменой A269S или заменами 498-NNN/AAA-500, или соответствующими заменами или пептидными вставками в капсидном белке капсида другого типа AAV.

2. Рекомбинантный капсидный белок AAV по п. 1, дополнительно содержащий аминокислотные замены 498-NNN/AAA-500 в капсидном белке AAV8 (SEQ ID NO: 66) или аминокислотные замены 496-NNN/AAA-498 в капсидном белке AAV9 (SEQ ID NO:67), или соответствующие замены в капсидном белке капсида другого типа AAV.

3. Рекомбинантный капсидный белок AAV по п. 1 или п. 2, который представляет собой капсид AAV8.BBB.LD (SEQ ID NO: 27), капсид AAV9.BBB.LD (SEQ ID NO: 29), капсид AAV9.496-NNN/AAA-498 (SEQ ID NO: 31), капсид AAV9.496-NNN/AAA-498 (SEQ ID NO: 32), капсид AAV9.W503R (SEQ ID NO: 33), капсид AAV9.Q474A (SEQ ID NO: 34), капсид AAV9.N272A.496-NNN/AAA-498 (SEQ ID NO: 91) или капсид AAV9.N266A.496-NNN/AAA-498 (SEQ ID NO: 92).

4. Рекомбинантный капсидный белок AAV по пп. 1-3, в котором аминокислотные замены или вставки находятся в капсиде AAV9, включая капсидный белок AAVPHP.eB, или капсиде AAV8.

5. Рекомбинантный капсидный белок AAV по п. 1 или п. 2, отличающийся тем, что капсид типа AAV представляет собой AAV rh.34, AAV4, AAV5, AAV hu.26, AAV rh.31, AAV hu.13, AAV hu.26, AAV hu.56, AAV hu.53, AAV7, AAV rh.10, AAV rh.64.R1, AAV rh.46 или AAV rh.73.

6. Рекомбинантный капсидный белок AAV по любому из пп. 1-5, который при включении в вектор гAAV обеспечивает повышенное нацеливание, трансдукцию или геномную интеграцию в клетки ЦНС по сравнению с вектором гAAV, содержащим соответствующий капсидный белок дикого типа без аминокислотных замен или пептидных вставок.

7. Рекомбинантный капсидный белок по п. 6, который при включении в вектор гAAV обеспечивает пониженное нацеливание, трансдукцию или геномную интеграцию в клетки печени по сравнению с вектором гAAV, содержащим соответствующий капсидный

белок дикого типа без аминокислотных замен или пептидных вставок.

8. Рекомбинантный капсидный белок по п. 6 или п. 7, который при включении в вектор гAAV обеспечивает пониженное нацеливание, трансдукцию или геномную интеграцию в клетки ганглии дорсальных корешков по сравнению с вектором гAAV, содержащим соответствующий капсидный белок без аминокислотных замен или пептидных вставок.

9. Рекомбинантный капсидный белок по любому из пп. 6-8, который при включении в вектор гAAV обеспечивает пониженное нацеливание, трансдукцию или геномную интеграцию в периферические нервные клетки по сравнению с вектором гAAV, содержащим соответствующий капсидный белок без аминокислотных замен или пептидных вставок.

10. Рекомбинантный капсидный белок AAV по любому из пп. 1-5, который при включении в вектор гAAV обеспечивает повышенное нацеливание, трансдукцию или геномную интеграцию в клетки скелетной мышцы и/или сердечной мышцы по сравнению с вектором гAAV, содержащим соответствующий капсидный белок без аминокислотных замен или пептидных вставок.

11. Рекомбинантный капсидный белок по п. 10, который при включении в вектор гAAV обеспечивает пониженное нацеливание, трансдукцию или геномную интеграцию в клетки печени по сравнению с вектором гAAV, содержащим соответствующий капсидный белок без аминокислотных замен или пептидных вставок.

12. Рекомбинантный капсидный белок по п. 10 или п. 11, который при включении в вектор гAAV обеспечивает пониженное нацеливание, трансдукцию или геномную интеграцию в клетки ЦНС по сравнению с вектором гAAV, содержащим соответствующий капсидный белок без аминокислотных замен или пептидных вставок.

13. Рекомбинантный капсидный белок по любому из пп. 10-12, который при включении в вектор гAAV обеспечивает пониженное нацеливание, трансдукцию или геномную интеграцию в клетки ганглии дорсальных корешков по сравнению с вектором гAAV, содержащим соответствующий капсидный белок без аминокислотных замен.

14. Нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую капсидный белок гAAV по любому из пп. 1-13, или кодирующую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности с ним и сохраняющую биологическую активность капсида.

15. Нуклеиновая кислота по п. 14, кодирующая капсидный белок гAAV по любому из пп. 1-13.

16. Упаковывающая клетка, способная экспрессировать нуклеиновую кислоту по

п. 14 или п. 15 для получения векторов AAV, содержащих капсидный белок, кодируемый указанной нуклеотидной последовательностью.

17. Вектор гAAV, содержащий капсидный белок по любому из пп. 1-13.

18. Вектор гAAV по п. 17, дополнительно содержащий трансген, кодирующий терапевтический белок, функционально связанный с регуляторной последовательностью для экспрессии в мышечных клетках и/или клетках ЦНС.

19. Фармацевтическая композиция, содержащая вектор гAAV по п. 17 или п. 18 и фармацевтически приемлемый носитель.

20. Способ доставки трансгена в клетку, включающий приведение указанной клетки в контакт с вектором гAAV по п. 17 или п. 18, при этом указанный трансген доставляют в указанную клетку.

21. Способ по п. 20, в котором клетка представляет собой клетку ЦНС, клетку сердечной мышцы или клетку скелетной мышцы.

22. Способ доставки трансгена в ткань-мишень субъекта, нуждающегося в этом, причем указанный способ включает введение указанному субъекту вектора гAAV по п. 17 или п. 18, при этом трансген доставляют в указанную ткань-мишень.

23. Способ по п. 22, в котором трансген представляет собой терапевтическое средство для лечения заболеваний мышц или заболеваний сердца, а указанная ткань-мишень представляет собой сердечную мышцу или скелетную мышцу.

24. Способ по п. 23, в котором гAAV вводят системно, в том числе внутривенно или внутримышечно.

25. Способ по п. 22, в котором трансген представляет собой терапевтическое средство для лечения заболеваний ЦНС, а указанная ткань-мишень представляет собой ткань ЦНС.

26. Способ по п. 25, в котором гAAV вводят интратекально или интрацеребровентрикулярно.

27. Фармацевтическая композиция для доставки трансгена в клетку, причем указанная фармацевтическая композиция содержит вектор гAAV по п. 17 или п. 18, при этом указанный трансген доставляют в указанную клетку.

28. Фармацевтическая композиция для доставки трансгена, кодирующего терапевтический белок, в ткань-мишень нуждающегося в этом субъекта, причем указанная фармацевтическая композиция содержит вектор гAAV по п. 17 или п. 18, при этом трансген доставляют в указанную ткань-мишень.

29. Фармацевтическая композиция по п. 27 или п. 28, причем указанный терапевтический белок представляет собой терапевтическое средство для лечения

заболеваний мышц или терапевтическое средство для лечения заболеваний сердца, а указанная ткань-мишень представляет собой сердечную мышцу или скелетную мышцу.

30. Фармацевтическая композиция по пп. 27-29, в которой гAAV проявляет по меньшей мере в 1,1 раза, 1,5 раза, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз или 10 раз большую трансдукцию в клетках сердечной мышцы или скелетной мышцы по сравнению с эталонным капсидом AAV.

31. Фармацевтическая композиция по пп. 27-30, в которой гAAV демонстрирует по меньшей мере на 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 99% меньшую трансдукцию в печени по сравнению с эталонным капсидом AAV.

32. Фармацевтическая композиция по пп. 27-31, в которой гAAV демонстрирует по меньшей мере на 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 99% меньшую трансдукцию в клетках ганглий дорсальных корешков по сравнению с эталонным капсидом AAV.

33. Фармацевтическая композиция по пп. 27, 28 или 32, причем указанный терапевтический белок представляет собой терапевтическое средство для лечения заболеваний ЦНС, а указанная ткань-мишень представляет собой ткань ЦНС.

34. Фармацевтическая композиция по пп. 27, 28, 32 или 33, в которой гAAV проявляет по меньшей мере в 1,1 раза, 1,5 раза, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз или 10 раз большую трансдукцию в клетках ЦНС по сравнению с эталонным капсидом AAV.

35. Фармацевтическая композиция по пп. 27, 28, 33 или 34, в которой гAAV демонстрирует по меньшей мере на 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 99% меньшую трансдукцию в печени по сравнению с эталонным капсидом AAV.

36. Фармацевтическая композиция по пп. 27, 28, 32 или 35, в которой гAAV демонстрирует по меньшей мере на 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 99% меньшую трансдукцию в клетках ганглий дорсальных корешков по сравнению с эталонным капсидом AAV.

37. Фармацевтическая композиция по пп. 27-36, в которой эталонный капсид AAV представляет собой AAV8 или AAV9.

38. Способ лечения расстройства ЦНС у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции по любому из пп. 27, 28, 32-37.

39. Способ лечения заболевания мышц у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции по любому из пп. 27-31 и 37.

40. Вектор гAAV по п. 18, причем трансген выбран из таблицы 1А или таблицы

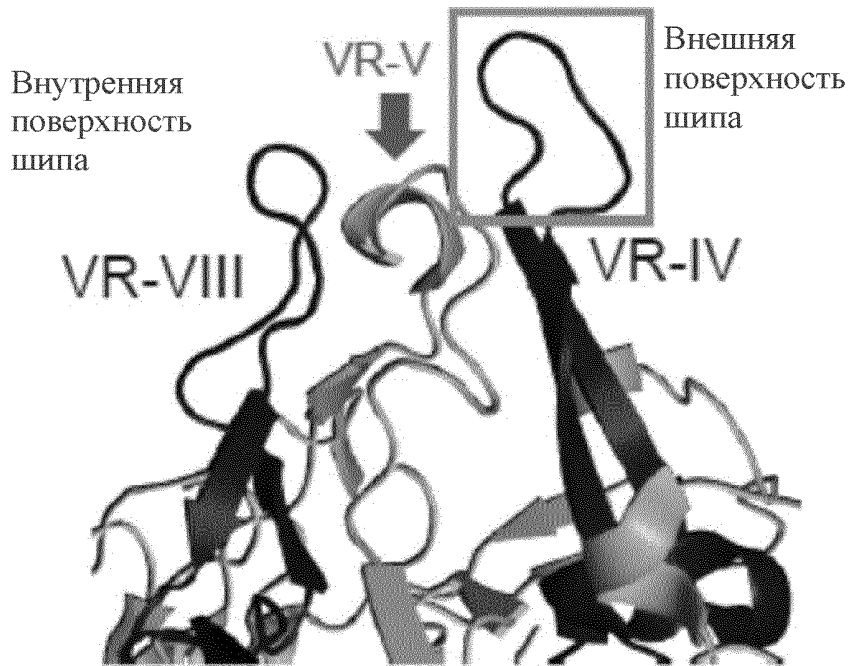
1В.

41. Способ по п. 20 или пп. 22-26, в котором трансген выбран из таблицы 1А или таблицы 1В.

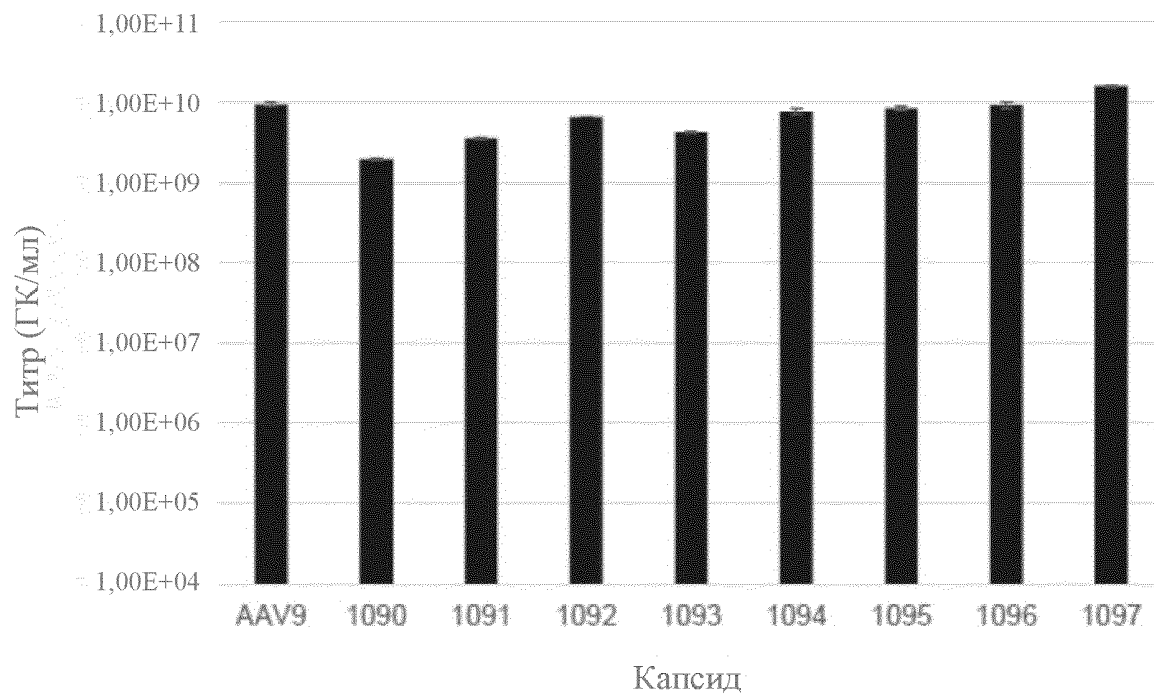
42. Фармацевтическая композиция для доставки трансгена по п. 27 или п. 28, в которой трансген выбран из таблицы 1А или таблицы 1В.

Консенсусные	VR-IV
1. Капсид AAV1	YYLSRTQ-NTGGTAXXQTLLFSQXGPI SNMSXQAKNW
2. Капсид AAV2	YYLNR TQ-NQSGSAQNKDL LFSRGS PAGMSVOPKNW
3. Капсид AAV3	YYLSRTN-TPSGTTTQSRLLQFSQAGASDTRDQSRNW
4. Капсид AAV4	YYLNR TQGTTSGTTNQSRLLFSQAGPQSM SLQARNW
5. Капсид AAV5	WGLQSTTTGTTLNAGTATTNFTKLRPTNFSNFKKNW
6. Капсид AAV6	YRFVSTN-NTGG-----VQFNK NLAGRYANTYKNW
7. Капсид AAV7	YYLNR TQ-NQSGSAQNKDL LFSRGS PAGMSVOPKNW
8. Капсид AAV8	YYLARTQSNPGGTAGNRELFYQGGPSTMAEQAKNW
9. Капсид AAV9	YYLSRTQ-TTGGTANTQTLLGFSQGGPNTMANQAKNW
10. Капсид AAVrh.10	YYLSKT--INGSGQNQQTKFSVAGP SNMAVQGRNY
	YYLSRTQ-STGGTAGTQQL LFSQAGPNNMSAQAKNW

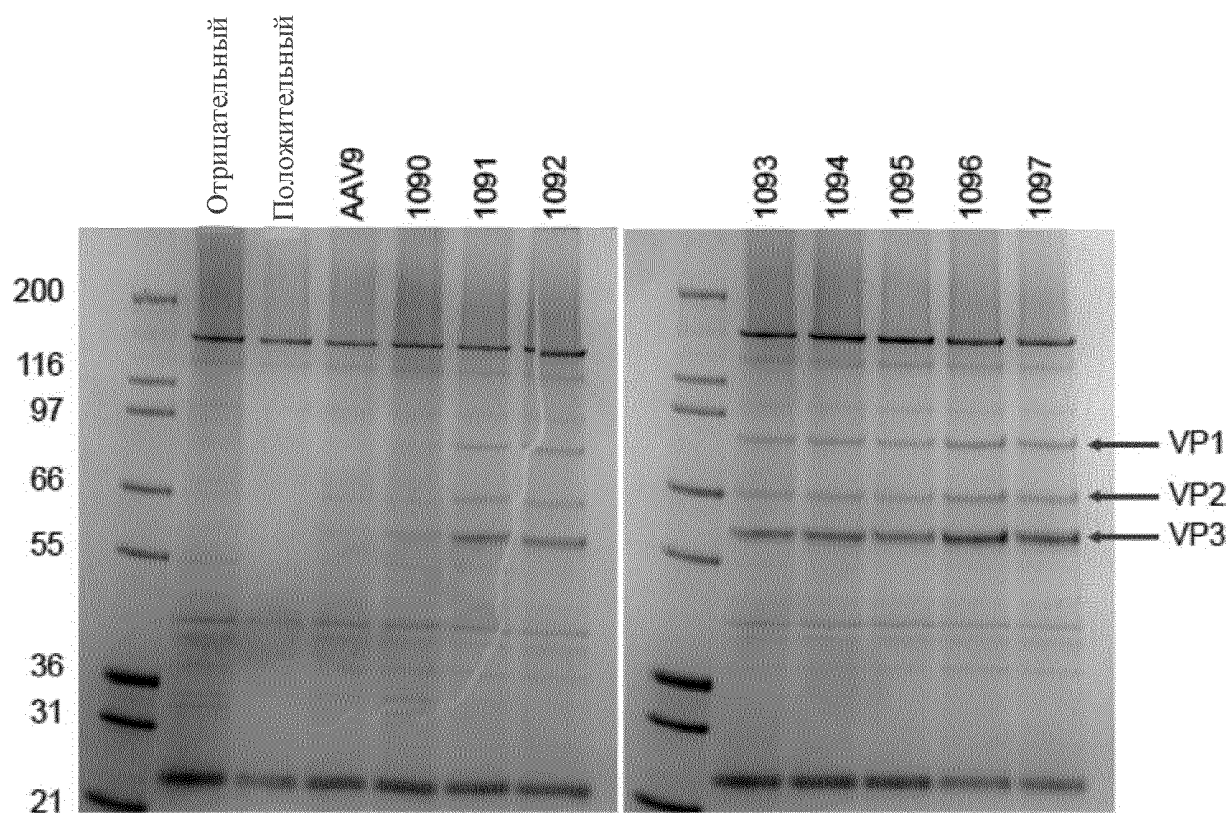
ФИГ. 1



ФИГ. 2

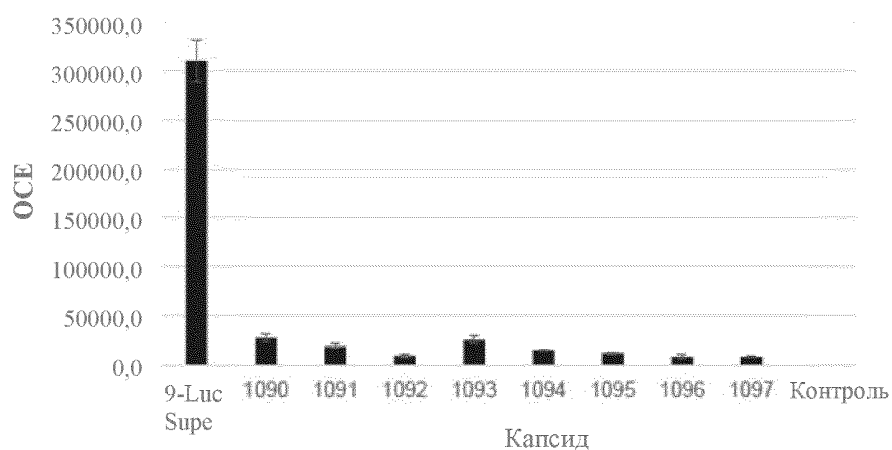


ФИГ. 3



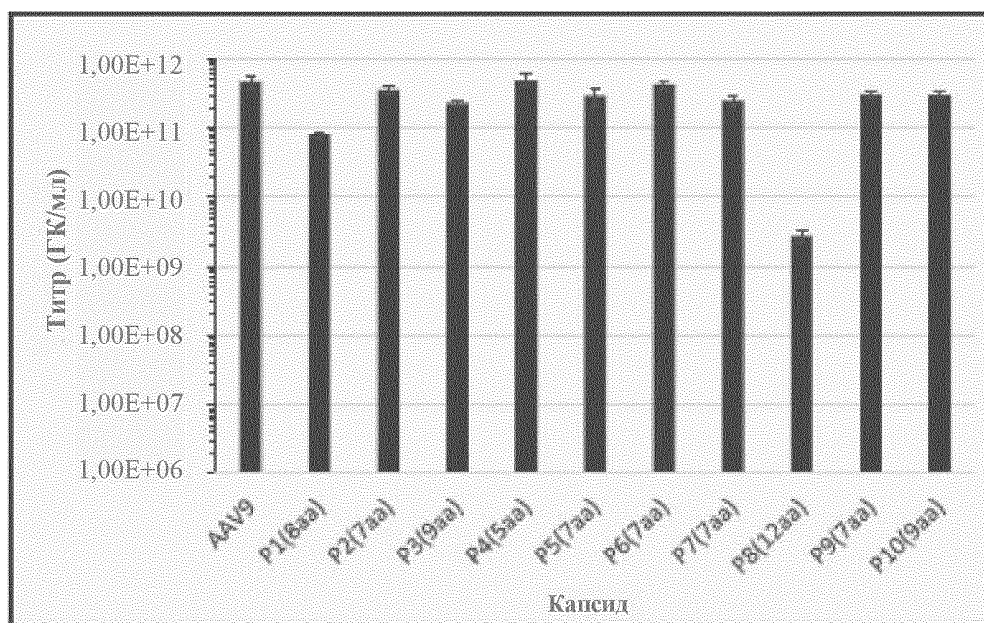
ФИГ. 4

Капсид	% 9-лус ДТ
9-лус	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

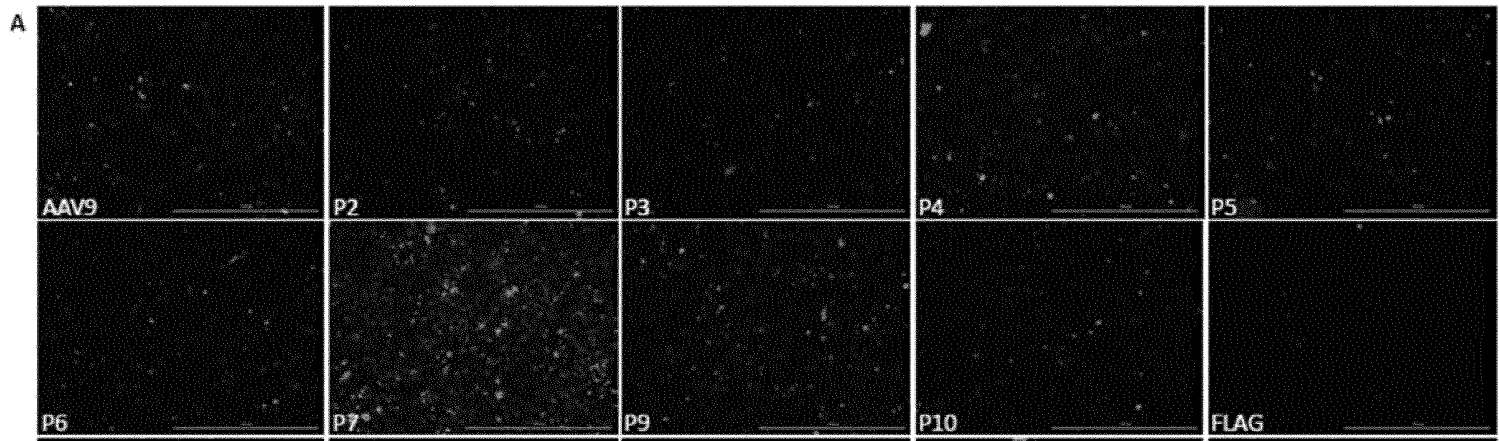


ФИГ. 5А

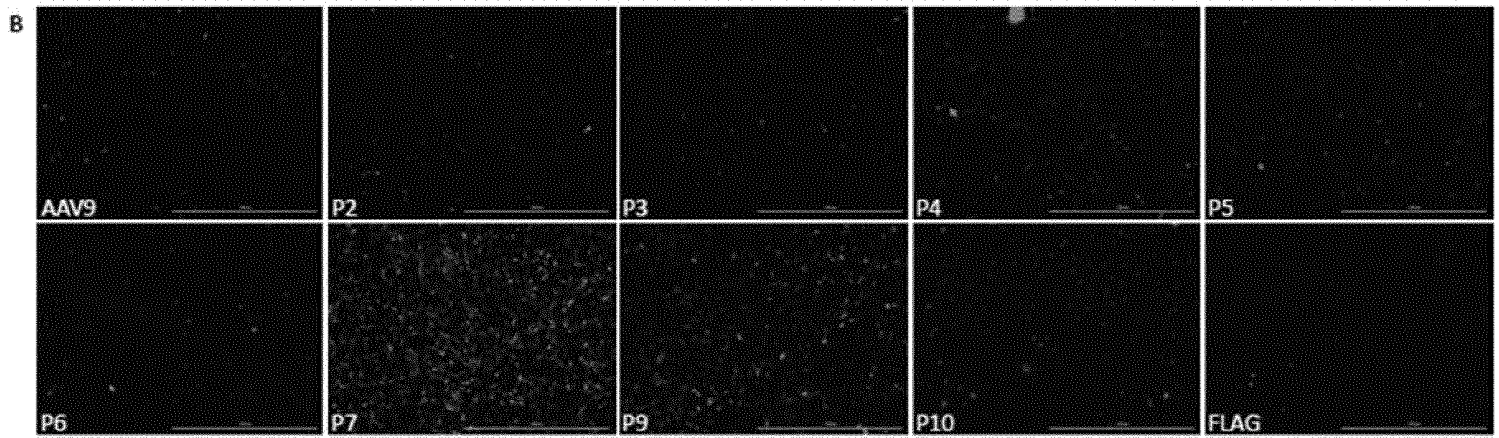
ФИГ. 5В



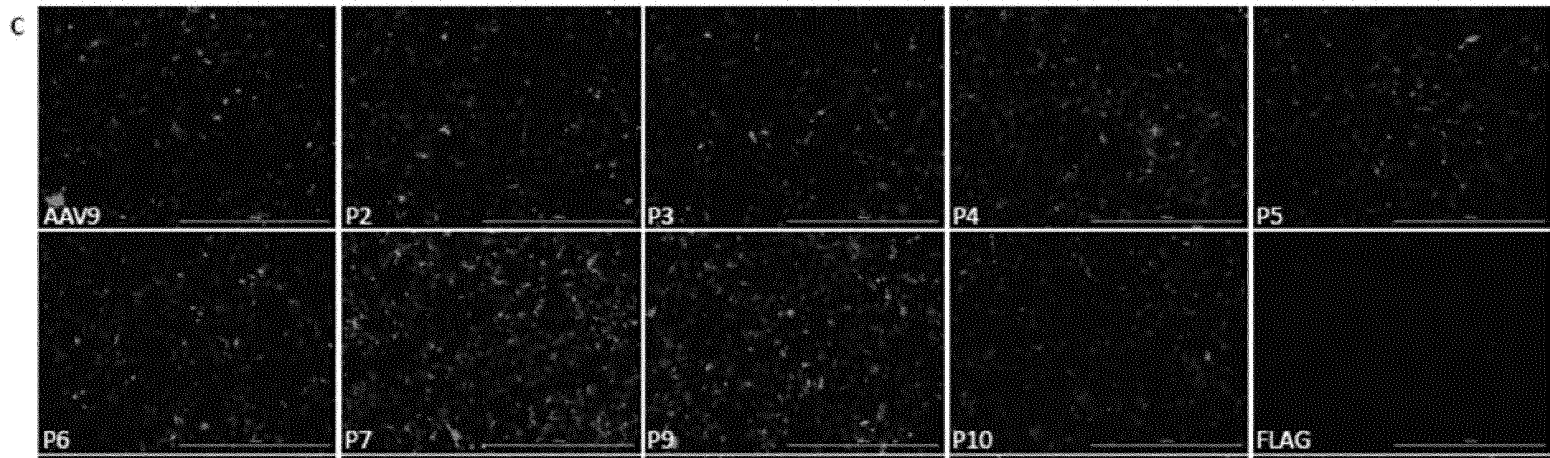
ФИГ. 6А



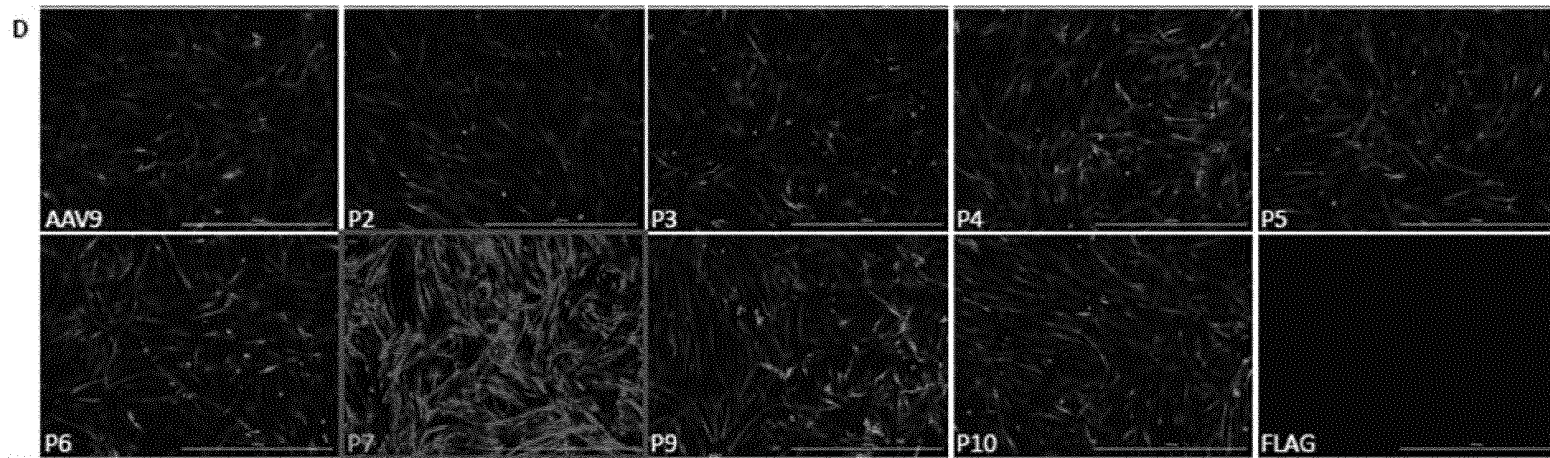
ФИГ. 6В - клеточная линия LEC2



ФИГ. 6С - клеточная линия HT-22



ФИГ. 6D - клеточная линия hSMES/D3



ФИГ. 6E - клеточная линия C2C12

ФИГ. 7 ВЫРАВНИВАНИЕ КАПСИДОВ AAV 1-9, 3В, 9с, RH10, RH20, RH39, RH73, RH74, HU37, HU12, HU21, HU26, HU37, HU51 и HU53 С САЙТАМИ ВСТАВКИ, ВЫДЕЛЕННЫМИ СЕРЫМ

AAV1	MAADGYLPDWLEDNLSEGI	REWWDLKPGAPKPKANQQKQDDG	RGLVLPGYKYL	GFENGLD	60	
AAV2	MAADGYLPDWLEDTLSEGI	RQWWKLRPGFPPPKPAERHKDDSRGLV	LPGYKYL	GFENGLD	60	
AAV3	MAADGYLPDWLEDNLSEGI	REWWALKPGVPPKANQQHQDNR	RGLVLPGYKYL	GFENGLD	60	
AAV3-3	MAADGYLPDWLEDNLSEGI	REWWALKPGVPPKANQQHQDNR	RGLVLPGYKYL	GFENGLD	60	
AAV3B	MAADGYLPDWLEDNLSEGI	REWWALKPGVPPKANQQHQDNR	RGLVLPGYKYL	GFENGLD	60	
AAV4	-MTDGYLPDWLEDNLSEGI	REWWALQPGAPKPKANQQHQDNR	RGLVLPGYKYL	GFENGLD	59	
AAV4-4	-MTDGYLPDWLEDNLSEGI	REWWALQPGAPKPKANQQHQDNR	RGLVLPGYKYL	GFENGLD	59	
AAV5	MSFVDHPPDWLEE-VGEGL	RFLGLEAGFPKPKPNQQHQDQAR	RGLVLPGYNYL	GFENGLD	59	
AAV6	MAADGYLPDWLEDNLSEGI	REWWDLKPGAPKPKANQQKQDDG	RGLVLPGYKYL	GFENGLD	60	
AAV7	MAADGYLPDWLEDNLSEGI	REWWDLKPGAPKPKANQQKQDNG	RGLVLPGYKYL	GFENGLD	60	
AAV8	MAADGYLPDWLEDNLSEGI	REWWALKPGAPKPKANQQKQDDG	RGLVLPGYKYL	GFENGLD	60	
AAV9	MAADGYLPDWLEDNLSEGI	REWWALKPGAPQPKANQQHQDNR	RGLVLPGYKYL	GFENGLD	60	
AAV9e	MAADGYLPDWLEDNLSEGI	REWWALKPGAPQPKANQQHQDNR	RGLVLPGYKYL	GFENGLD	60	
rh.10	MAADGYLPDWLEDNLSEGI	REWWDLKPGAPKPKANQQKQDDG	RGLVLPGYKYL	GFENGLD	60	
rh.20	MAADGYLPDWLEDNLSEGI	REWWDLKPGAPKPKANQQKQDDG	RGLVLPGYKYL	GFENGLD	60	
rh.39	MAADGYLPDWLEDNLSEGI	REWWALKPGAPKPKANQQKQDDG	RGLVLPGYKYL	GFENGLD	60	
rh.73	MAADGYLPDWLEDNLSEGI	REWWDLKPGAPKPKANQQKQDDG	RGLVLPGYKYL	GFENGLD	60	
rh.74v1	MAADGYLPDWLEDNLSEGI	REWWDLKPGAPKPKANQQKQDNG	RGLVLPGYKYL	GFENGLD	60	
rh.74v2	MAADGYLPDWLEDNLSEGI	REWWDLKPGAPKPKANQQKQDNG	RGLVLPGYKYL	GFENGLD	60	
hu.12	MAADGYLPDWLEDTLSEGI	RQWWKLRPGFPPPKPAERHKDDSRGLV	LPGYKYL	GFENGLD	60	
hu.21	MAADGYLPDWLEDTLSEGI	RQWWKLRPGFPPPKPAERHKDDSRGLV	LPGYKYL	GFENGLD	60	
hu.26	MAADGYLPDWLEDTLSEGI	RQWWKLRPGFPPPKPAERHKDDSRGLV	LPGYKYL	GFENGLD	60	
hu.37	MAADGYLPDWLEDNLSEGI	REWWDLKPGAPKPKANQQKQDDG	RGLVLPGYKYL	GFENGLD	60	
hu.51	MAADGYLPDWLEDTLSEGI	RQWWKLRPGFPPPKPAERHKDDSRGLV	LPGYKYL	GFENGLD	60	
hu.53	MAADGYLPDWLEDTLSEGI	RQWWKLRPGFPPPKPAERHKDDSRGLV	LPGYKYL	GFENGLD	60	
	..*****:	..**:*:	*: * * * *	..:*	*****:**** *	

AAV1	KGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQ	120
AAV2	KGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQ	120
AAV3	KGEPVNEADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQ	120
AAV3-3	KGEPVNEADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQ	120
AAV3B	KGEPVNEADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQ	120
AAV4	KGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADADEFQORLQGDTSFGGNLGRAVFQ	119
AAV4-4	KGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADADEFQORLQGDTSFGGNLGRAVFQ	119
AAV5	RGEPVNRADDEVAREHDISYNEQLEAGDNPYLKYNHADADEFQEKLADDTSFGGNLGKAVFQ	119
AAV6	KGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQ	120
AAV7	KGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQ	120
AAV8	KGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLQAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQ	120
AAV9	KGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQ	120
AAV9e	KGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQ	120
rh.10	KGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQ	120
rh.20	KGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQ	120
rh.39	KGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQ	120
rh.73	KGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQ	120
rh.74v1	KGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLQAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQ	120
rh.74v2	KGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLQAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQ	120
hu.12	KGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQ	120
hu.21	KGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQ	120
hu.26	KGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQ	120
hu.37	KGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQ	120
hu.51	KGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQ	120
hu.53	KGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQ	120

AAV1	AKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEQSPQ-EPDSSSGIGKTGQQPAKKRLNFGQTGDS	179
AAV2	AKKRVLEPLGLVEEVPVKTAPGKKRPVEHSPV-EPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDA	179
AAV3	AKKRILEPLGLVEEAAKTAPGKKGAVDQSPQ-EPDSSSGVGKSGKQPARKRLNFGQTGDS	179
AAV3-3	AKKRILEPLGLVEEAAKTAPGKKGAVDQSPQ-EPDSSSGVGKSGKQPARKRLNFGQTGDS	179
AAV3B	AKKRILEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVDQSPQ-EPDSSSGVGKSGKQPARKRLNFGQTGDS	179
AAV4	AKKRVLEPLGLVEQAGETAPGKKRPLIESPQ-QPDSSTGIGKKGKQPAKKKLVFEDETG	178
AAV4-4	AKKRVLEPLGLVEQAGETAPGKKRPLIESPQ-QPDSSTGIGKKGKQPAKKKLVFEDETG	178
AAV5	AKKRVLEPFGLVEEGAKTAPTGKRIDDHFPKRRKARTEEDSKP-----STSSDA	168
AAV6	AKKRVLEPFGLVEEGAKTAPGKKRPVEQSPQ-EPDSSSGIGKTGQQPAKKRLNFGQTGDS	179
AAV7	AKKRVLEPLGLVEEGAKTAPAKKRPVEPSQRS PDSSTGIGKKGQQPARKRLNFGQTGDS	180
AAV8	AKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEPSQRS PDSSTGIGKKGQQPARKRLNFGQTGDS	180
AAV9	AKKRILEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEQSPQ-EPDSSAGIGKSGAQPAKKRLNFGQTGDT	179
AAV9e	AKKRILEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEQSPQ-EPDSSAGIGKSGAQPAKKRLNFGQTGDT	179
rh.10	AKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEPSQRS PDSSTGIGKKGQQPAKKRLNFGQTGDS	180
rh.20	AKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEPSQRS PDSSTGIGKTGQQPAKKRLNFGQTGDS	180
rh.39	AKKRVLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEPSQRS PDSSTGIGKKGQQPAKKRLNFGQTGDS	180
rh.73	AKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEPSQRS PDSSTGIGKKGQQPAKKRLNFGQTGDS	180
rh.74v1	AKKRVLEPLGLVESPVKTAPGKKRPVEPSQRS PDSSTGICCKGQQPAKKRLNFGQTGDS	180
rh.74v2	AKKRVLEPLGLVESPVKTAPGKKRPVEPSQRS PDSSTGIGKKGQQPAKKRLNFGQTGDS	180
hu.12	AKKRVLEPLGLVEEVPVKTAPGKKRPVEHSPV-EPDSSSGTGKAGHQPAKKRLNFGQTGDA	179
hu.21	AKKRILEPLGLVEEVPVKTAPGKKRPVEHSPA-EPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDA	179
hu.26	AKKRILEPLGLVEEVPVKTAPGKKRPVEHSPA-EPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDA	179
hu.37	AKKRVLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEPSQRS PDSSTGIGKKGQQPAKKRLNFGQTGDS	180
hu.51	AKKRVLEPLGLVGEVPVKTAPGKKRPVEHSPV-EPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDA	179
hu.53	AKKRVLEPLGLVEEVPVKTAPGKKRPVEHSPA-EPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDA	179

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

AAV1	ESVP-DPQPLGEPPATPAAVGPTTMAAGGAPMADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDR	238
AAV2	DSVP-DPQPLGQPPAAPSLGNTMTATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMDGR	238
AAV3	ESVP-DPQPLGEPPAAPSTLSGNTMASGGGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSQWLGD	238
AAV3-3	ESVP-DPQPLGEPPAAPSTLSGNTMASGGGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSQWLGD	238
AAV3B	ESVP-DPQPLGEPPAAPSTLSGNTMASGGGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSQWLGD	238
AAV4	GDGP----PEGSTSGAMS--DDSEMRAAAGGAAVEGGQADGVGNASGDWHCDSTWSEGH	232
AAV4-4	GDGP----PEGSTSGAMS--DDSEMRAAAGGAAVEGGQADGVGNASGDWHCDSTWSEGH	232
AAV5	EAGFSGSQQLQIFAPASSLCADTMSAGGGGPLGDNNQCADGVGNASGDWHCDSTWMDGR	228
AAV6	ESVP-DPQPLGEPPATPAAVGPTTMAAGGAPMADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDR	238
AAV7	ESVP-DPQPLGEPPAAPSVGSGTVAAGGAPMADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDR	239
AAV8	ESVP-DPQPLGEPPAAPSGVGPNTMAAGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGDR	239
AAV9	ESVP-DPQPIGEPPAAPSGVGLTMAAGGAPVADNNEGADGVGSSSGNWHCDSQWLGD	238
AAV9e	ESVP-DPQPIGEPPAAPSGVGLTMAAGGAPVADNNEGADGVGSSSGNWHCDSQWLGD	238
rh.10	ESVP-DPQPIGEPPAGPSGLGSGTMAAGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGDR	239
rh.20	ESVP-DPQPIGEPPAGPSGLGSGTMAAGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGDR	239
rh.39	ESVP-DPQPIGEPPAGPSGLGSGTMAAGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGDR	239
rh.73	ESVP-DPQPLGEPPAAPSSVSGTMAAGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGDR	239
rh.74v1	ESVP-DPQPIGEPPAGPSGLGSGTMAAGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGDR	239
rh.74v2	ESVP-DPQPIGEPPAGPSGLGSGTMAAGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGDR	239
hu.12	DSVP-DPQPLGQPPAAPSTLSGTTMATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSQWLGD	238
hu.21	DSVP-DPRLGQPPAAPSLGNTMTASGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMDGR	238
hu.26	DSVP-DPQPLGQPPAAPSLGNTMTASGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMDGR	238
hu.37	ESVP-DPQPIGEPPAGPSGLGSGTMAAGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGDR	239
hu.51	DSVP-DPQPLGQPPAAPSLGNTMTATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMDGR	238
hu.53	DSVP-DPQPLRQPPAAPSTLSGTTMATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSQWLGD	238

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

AAV1	VITTSRTWALPTYNNHLYKQISSAST-GASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSRWD	297
AAV2	VITTSRTWALPTYNNHLYKQISSQ-S-GASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSRWD	296
AAV3	VITTSRTWALPTYNNHLYKQISSQ-S-GASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSRWD	296
AAV3-3	VITTSRTWALPTYNNHLYKQISSQ-S-GASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSRWD	296
AAV3B	VITTSRTWALPTYNNHLYKQISSQ-S-GASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSRWD	296
AAV4	VITTSRTWVLPPTYNNHLYKRLGE----SLQSNFYNGFSTPWGYFDFNRFHCHFSRWD	287
AAV4-4	VITTSRTWVLPPTYNNHLYKRLGE----SLQSNFYNGFSTPWGYFDFNRFHCHFSRWD	287
AAV5	VVTKSRTWVLPSTYNNHLYKQISSAST-GSNANAYFGYSTPWGYFDFNRFHSHWSPRD	287
AAV6	VITTSRTWALPTYNNHLYKQISSAST-GASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSRWD	297
AAV7	VITTSRTWALPTYNNHLYKQISSAST-GSTNDNTYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSRWD	298
AAV8	VITTSRTWALPTYNNHLYKQISSNGTSGGASTNDNTYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSRWD	299
AAV9	VITTSRTWALPTYNNHLYKQISSNSTSGGSSNDNAYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSRWD	298
AAV9e	VITTSRTWALPTYNNHLYKQISSNSTSGGSSNDNAYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSRWD	298
rh.10	VITTSRTWALPTYNNHLYKQISSNGTSGGSSNDNTYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSRWD	299
rh.20	VITTSRTWALPTYNNHLYKQISSNGTSGGSSNDNTYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSRWD	299
rh.39	VITTSRTWALPTYNNHLYKQISSNGTSGGSSNDNTYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSRWD	299
rh.73	VITTSRTWALPTYNNHLYKQISSNGTSGGSSNDNTYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSRWD	299
rh.74v1	VITTSRTWALPTYNNHLYKQISSNGTSGGSSNDNTYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSRWD	299
rh.74v2	VITTSRTWALPTYNNHLYKQISSNGTSGGSSNDNTYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSRWD	299
hu.12	VITTSRTWALPTYNNHLYKQISSQS--GASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSRWD	296
hu.21	VITTSRTWALPTYNNHLYKQISSQS--GASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSRWD	296
hu.26	VITTSRTWALPTYNNHLYKQISSQS--GASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSRWD	296
hu.37	VITTSRTWALPTYNNHLYKQISSNGTSGGSSNDNTYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSRWD	299
hu.51	VITTSRTWALPTYNNHLYKQISSQS--GASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSRWD	296
hu.53	VITTSRTWALPTYNNHLYKQISSQS--GASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSRWD	296

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

AAV1	QRLINNNWCFRPKRLNFKLEFNIQVKEVTTNDGVTTIANNLTSTVQVFSSEYQLPYVVLGS	357
AAV2	QRLINNNWCFRPKRLNFKLEFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVVLGS	356
AAV3	QRLINNNWCFRPKKLSFKLEFNIQVRGVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVVLGS	356
AAV3-3	QRLINNNWCFRPKKLSFKLEFNIQVRGVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVVLGS	356
AAV3B	QRLINNNWCFRPKKLSFKLEFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVVLGS	356
AAV4	QRLINNNWGMRPKAMRVKIFNIQVKEVTTNGETTVANNLTSTVQIFADSSYELPYVMDA	347
AAV4-4	QRLINNNWGMRPKAMRVKIFNIQVKEVTTNGETTVANNLTSTVQIFADSSYELPYVMDA	347
AAV5	QRLINNYWCFRPKSLRVKLFENIQVKEVTVQDSTTTIANNLTSTVQVFTDDDYQLPYVVON	347
AAV6	QRLINNNWCFRPKRLNFKLEFNIQVKEVTTNDGVTTIANNLTSTVQVFSSEYQLPYVVLGS	357
AAV7	QRLINNNWCFRPKRLNFKLEFNIQVKEVTTNDGVTTIANNLTSTVQVFSSEYQLPYVVLGS	358
AAV8	QRLINNNWCFRPKRLSFKLEFNIQVKEVTQNEGTKTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVVLGS	359
AAV9	QRLINNNWCFRPKRLNFKLEFNIQVKEVTQNEGTKTIANNLTSTVQVFTDSDYQLPYVVLGS	358
AAV9c	QRLINNNWCFRPKRLNFKLEFNIQVKEVTQNEGTKTIANNLTSTVQVFTDSDYQLPYVVLGS	358
rh.10	QRLINNNWCFRPKRLNFKLEFNIQVKEVTQNEGTKTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVVLGS	359
rh.20	QRLINNNWCFRPKRLNFKLEFNIQVKEVTQNEGTKTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVVLGS	359
rh.39	QRLINNNWCFRPKRLSFKLEFNIQVKEVTQNEGTKTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVVLGS	359
rh.73	QRLINNNWCFRPKRLSFKLEFNIQVKEVTQNEGTKTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVVLGS	359
rh.74v1	QRLINNNWCFRPKRLNFKLEFNIQVKEVTQNEGTKTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVVLGS	359
rh.74v2	QRLINNNWCFRPKRLNFKLEFNIQVKEVTQNEGTKTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVVLGS	359
hu.12	QRLINNNWCFRPKRLNFKLEFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVVLGS	359
hu.21	QRLINNNWCFRPKRLSFKLEFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVVLGS	356
hu.26	QRLINNNWCFRPKRLSFKLEFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVVLGS	356
hu.37	QRLINNNWCFRPKRLSFKLEFNIQVKEVTQNEGTKTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVVLGS	359
hu.51	QRLINNNWCFRPKRLNFKLEFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVVLGS	356
hu.53	QRLINNNWCFRPKRLNFKLEFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVVLGS	356

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

AAV1	AHQGCLPFPFPADVEMIPQYGYLTLNNG---SQAVGRSSFYCLEYFSPQMLRTGNNFTFSY	414
AAV2	AHQGCLPFPFPADVEMVPQYGYLTLNNG---SQAVGRSSFYCLEYFSPQMLRTGNNFTFSY	413
AAV3	AHQGCLPFPFPADVEMVPQYGYLTLNNG---SQAVGRSSFYCLEYFSPQMLRTGNNFQFSY	413
AAV3-3	AHQGCLPFPFPADVEMVPQYGYLTLNNG---SQAVGRSSFYCLEYFSPQMLRTGNNFQFSY	413
AAV3B	AHQGCLPFPFPADVEMVPQYGYLTLNNG---SQAVGRSSFYCLEYFSPQMLRTGNNFQFSY	413
AAV4	QQEGSLPFPFPNDVEMVPQYGYCGLVTGNTSQQOTDRNAFYCLEYFSPQMLRTGNNFEITY	407
AAV4-4	GQEGSLPFPFPNDVEMVPQYGYCGLVTGNTSQQOTDRNAFYCLEYFSPQMLRTGNNFEITY	407
AAV5	GTEGCLPAFPFPQVFTLPQYGYATLNRDNT-ENPTERRSSFECLEYFSPKMLRTGNNFEFTY	406
AAV6	AHQGCLPFPFPADVEMIPQYGYLTLNNG---SQAVGRSSFYCLEYFSPQMLRTGNNFTFSY	414
AAV7	AHQGCLPFPFPADVEMIPQYGYLTLNNG---SQSVGRSSFYCLEYFSPQMLRTGNNFEFSY	415
AAV8	AHQGCLPFPFPADVEMIPQYGYLTLNNG---SQAVGRSSFYCLEYFSPQMLRTGNNFEFTY	416
AAV9	AHEGCLPFPFPADVEMIPQYGYLTLNDG---SQAVGRSSFYCLEYFSPQMLRTGNNFQFSY	415
AAV9e	AHEGCLPFPFPADVEMIPQYGYLTLNDG---SQAVGRSSFYCLEYFSPQMLRTGNNFQFSY	415
rh.10	AHQGCLPFPFPADVEMIPQYGYLTLNNG---SQAVGRSSFYCLEYFSPQMLRTGNNFEFSY	416
rh.20	AHQGCLPFPFPADVEMIPQYGYLTLNNG---SQAVGRSSFYCLEYFSPQMLRTGNNFEFSY	416
rh.39	AHQGCLPFPFPADVEMIPQYGYLTLNNG---SQAVGRSSFYCLEYFSPQMLRTGNNFEFSY	416
rh.73	AHQGCLPFPFPADVEMIPQYGYLTLNNG---SQAVGRSSFYCLEYFSPQMLRTGNNFEFSY	416
rh.74v1	AHQGCLPFPFPADVEMIPQYGYLTLNNG---SQAVGRSSFYCLEYFSPQMLRTGNNFEFSY	416
rh.74v2	AHQGCLPFPFPADVEMIPQYGYLTLNNG---SQAVGRSSFYCLEYFSPQMLRTGNNFEFSY	416
hu.12	AHQGCLPFPFPADVEMVPQYGYLTLNNG---SQAVGRSSFYCLEYFSPQMLRTGNNFTFSY	413
hu.21	AHQGCLPFPFPADVEMVPQYGYLTLNNG---SQAVGRSSFYCLEYFSPQMLRTGNNFTFSY	413
hu.26	AHQGCLPFPFPADVEMVPQYGYLTLNNG---SQAVGRSSFYCLEYFSPQMLRTGNNFTFSY	413
hu.37	AHQGCLPFPFPADVEMIPQYGYLTLNNG---SQAVGRSSFYCLEYFSPQMLRTGNNFEFSY	416
hu.51	AHQGCLPFPFPADVEMVPQYGYLTLNNG---SQAVGRSSFYCLEYFSPQMLRTGNNFTFSY	413
hu.53	AHQGCLPFPFPADVEMVPQYGYLTLNNG---SQAVGRSSFYCLEYFSPQMLRTGNNFQFSY	413

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

AAV1	TFEEVPPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLNRTON-QSGSAQNKDLLFSRQSPAGMSV	473
AAV2	TFEDVPPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTN-TPSGTTQSRLLQFSQAGASDIRD	472
AAV3	TFEDVPPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLNRTOGTTSGTTNQSRLQFSQAGPQMSL	473
AAV3-3	TFEDVPPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLNRTOGTTSGTTNQSRLQFSQAGPQMSL	473
AAV3B	TFEDVPPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLNRTOGTTSGTTNQSRLQFSQAGPQMSL	473
AAV4	SFEKVPFHSSMYAHSQSLDRLMNPLIDQYLWGLQSTTGTTLNAGTATTNFTKLRPTNFSN	467
AAV4-4	SFEKVPFHSSMYAHSQSLDRLMNPLIDQYLWGLQSTTGTTLNAGTATTNFTKLRPTNFSN	467
AAV5	NFEEVPPFHSSPAPSONLPKLANPLVDQYLYRFVSTNNTG-----GVQFNKNLAGRYAN	459
AAV6	TFEDVPPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLNRTON-QSGSAQNKDLLFSRQSPAGMSV	473
AAV7	SFEDVPPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLARTQSNPFGTAGNRELQFYQGGPSTMAE	475
AAV8	TFEDVPPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTQT-TGGTANTQT LGFSQGGPNTMAN	475
AAV9	EFENVPPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSKTINGSS--GQNOQT LKFSVAGPSNMAV	473
AAV9e	EFENVPPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSKTINGSS--GQNOQT LKFSVAGPSNMAV	473
rh.10	QFEDVPPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTQS-TGGTAGTQQLLFSQAGPNNMSA	475
rh.20	QFEDVPPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTQS-TGGTAGTQQLLFSQAGPNNMSA	475
rh.39	TFEDVPPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTQS-TGGTOGTQQLLFSQAGPANMSA	475
rh73	TFEDVPPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTQS-TGGTAGTQQLLFSQAGPSNMSA	475
rh.74v1	NFEDVPPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTQS-TGGTAGTQQLLFSQAGPNNMSA	475
rh.74v2	NFEDVPPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTQS-TGGTAGTQQLLFSQAGPNNMSA	475
hu.12	TFEDVPPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLNRTO-NSGTLOOSRLLFSQAGPTSMML	472
hu.21	TFEDVPPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTN-TPSGTTTMSRLQFSQAGASDIRD	472
hu.26	TFEDVPPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTN-TPSGTTTMSRLQFSQAGASDIRD	472
hu.37	TFEDVPPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTQS-TGGTQGTQQLLFSQAGPANMSA	475
hu.51	TFEDVPPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSTTN-TPSGTTTQSRLLQFSQAGASDIRD	472
hu.53	TFEDVPPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLNRTO-TASGTPQ-QSRLQFSQAGPTSMML	471

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

AAV1	QPKNWLPGPCYRQQRVSKTKTDNNNSNF-----TWTGASKYNLNGRESIINPGTAMASHK	528
AAV2	QSRNWLPGPCYRQQRVSKTADNNSSEY-----SWTGATKYHLNGRDSLVPNGPAMASHK	527
AAV3	QARNWLPGPCYRQQRVSKTANDNNSNF-----PWTAAASKYHLNGRDSLVPNGPAMASHK	528
AAV3-3	QARNWLPGPCYRQQRVSKTANDNNSNF-----PWTAAASKYHLNGRDSLVPNGPAMASHK	528
AAV3B	QARNWLPGPCYRQQRVSKTANDNNSNF-----PWTAAASKYHLNGRDSLVPNGPAMASHK	528
AAV4	FKKNWLPGPSIKQQGFSKTANQYKIPATGSDSLIKYETHSLDGRWSALTPGPPMATAG	527
AAV4-4	FKKNWLPGPSIKQQGFSKTANQYKIPATGSDSLIKYETHSLDGRWSALTPGPPMATAG	527
AAV5	IYKNWPPGPMGRITQGWNLGSGVNRASVS-----AFATTNRMELEGASVQVPPQPNGMTNN	514
AAV6	QPKNWLPGPCYRQQRVSKTKTDNNNSNF-----TWTGASKYNLNGRESIINPGTAMASHK	528
AAV7	QAKNWLPGPCFRQQRVSKTLDQNNNSNF-----AWTGATKYHLNGRDSLVPNGVAMATHK	530
AAV8	QAKNWLPGPCYRQQRVSTTTGQNNNSNF-----AWTAGTKYHLNGRNSLANPFIAMATHK	530
AAV9	QGRNYIPGPSYRQQRVSTTVTQNNNSSEF-----AWPGASSWALNGRNSLMNPGPAMASHK	528
AAV9e	QGRNYIPGPSYRQQRVSTTVTQNNNSSEF-----AWPGASSWALNGRNSLMNPGPAMASHK	528
rh.10	QAKNWLPGPCYRQQRVSTTLSQNNNSNF-----AWTGATKYHLNGRDSLVPNGVAMATHK	530
rh.20	QAKNWLPGPCYRQQRVSTTLSQNNNSNF-----AWTGATKYHLNGRDSLVPNGVAMATHK	530
rh.39	QAKNWLPGPCYRQQRVSTTLSQNNNSNF-----AWTGATKYHLNGRDSLVPNGVAMATHK	530
rh.73	QARNWLPGPCYRQQRVSTTLSQNNNSNF-----AWTGATKYHLNGRDSLVPNGVAMATNK	530
rh.74v1	QAKNWLPGPCYRQQRVSTTLSQNNNSNF-----AWTGATKYHLNGRDSLVPNGVAMATHK	530
rh.74v2	QAKNWLPGPCYRQQRVSTTLSQNNNSNF-----AWTGATKYHLNGRDSLVPNGVAMATHK	530
hu.12	QAKNWLPGPCYRQQRVSKQANDNNSNF-----PWTAAATKYHLNGRDSLVPNGPAMASHK	527
hu.21	QSRNWLPGPCYRQQRVSKTADNNSSEY-----SWTGATKYHLNGRDSLVPNGPAMASHK	527
hu.26	QSRNWLPGPCYRQQRVSKTADNNSSEY-----SWTGATKYHLNGRDSLVPNGPAMASHK	527
hu.37	QAKNWLPGPCYRQQRVSTTLSQNNNSNF-----AWTGATKYHLNGRDSLVPNGVAMATHK	530
hu.51	QSRNWLPGPCYRQQRVSKTADNNSSEY-----SWTGATKYHLNGRDSLVPNGPAMASHK	527
hu.53	QAKNWLPGPCYRQQRVSKQANDNNSNF-----PWTGATKYHLNGRDSLVPNGPAMASHK	526

:*::*** : * * * * * * * * * * * * * * * *

AAV1	DDEDKFFPMSGVMI FGKESAGA---SNTALDNVMI TDEEEIKATNPVATERFGTVAVNFC	585
AAV2	DDEEKFFPQSGVLI FGKQSGEK---TNVDIEKVMITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNLC	584
AAV3	DDEEKFFPMHGNI LFGKEGTTA---SNAELDNVMI TDEEEIRTTNPVATEQYGTVANNLQ	585
AAV3-3	DDEEKFFPMHGNI LFGKEGTTA---SNAELDNVMI TDEEEIRTTNPVATEQYGTVANNLQ	585
AAV3B	DDEEKFFPMHGNI LFGKEGTTA---SNAELDNVMI TDEEEIRTTNPVATEQYGTVANNLQ	585
AAV4	PADSKFSN-SQLIFAGPKQNGN---TATVPGTLIFTSEEELAAATNATDTDMWGNLPGGDQ	583
AAV4-4	PADSKFSN-SQLIFAGPKQNGN---TATVPGTLIFTSEEELAAATNATDTDMWGNLPGGDQ	583
AAV5	LQGSNTYALENTMI FNSQPANPGTTATYLEGNMLITSESETQPVNRVAYNVGGQMATNNQ	574
AAV6	DDKDKFFPMSGVMI FGKESAGA---SNTALDNVMI TDEEEIKATNPVATERFGTVAVNLC	585
AAV7	DDEDRFFPSSGVLI FGKGTATN----KTTLENVLMTNEEEIRTPNPVATEEYGVVSSNLC	586
AAV8	DDEERFFPSSNGILI FGKQNAAR---DNADYSDVMLTSEEEIKTTNPVATEEYGVVADNLC	587
AAV9	EGEDRFFPLSGSLIFGKQGTGR---DNVDADKVMITNEEEIKTTNPVATESYGVQVATNHC	585
AAV9e	EGEDRFFPLSGSLIFGKQGTGR---DNVDADKVMITNEEEIKTTNPVATESYGVQVATNHC	585
rh.10	DDEERFFPSSGVLMFGKQAGK---DNVDYSSVMLTSEEEIKTTNPVATEQYGVVADNLC	587
rh.20	DDEERFFPSSGVLMFGKQAGK---DNVDYSSVMLTSEEEIKTTNPVATEQYGVVADNLC	587
rh.39	DDEERFFPSSGVLMFGKQAGK---DNVDYSSVMLTSEEEIKTTNPVATEQYGVVADNLC	587
rh.73	DDEERFFPSSGVLMFGKQAGK---DNVDYSSVMLTSEEEIKTTNPVATEQYGVVADNLC	587
rh.74v1	DDEERFFPSSGVLMFGKQAGK---DNVDYSSVMLTSEEEIKTTNPVATEQYGVVADNLC	587
rh.74v2	DDEERFFPSSGVLMFGKQAGK---DNVDYSSVMLTSEEEIKTTNPVATEQYGVVADNLC	587
hu.12	DDEEKFFPMHGTLIFGKQGTNA---NDADLEHVMI TDEEEIRTTNPVATEQYGNVSNLNC	584
hu.21	DDEEKYFPQSGVLI FGKQDSGK---TNVDIEKVMITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNLC	584
hu.26	DDEEKYFPQSGVLI FGKQDSGK---TNVDIEKVMITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNLC	584
hu.37	DDEERFFPSSGVLMFGKQAGK---DNVDYSSVMLTSEEEIKTTNPVATEQYGVVADNLC	587
hu.51	DNEEKFFPQSGVLI FGKQSGEK---TNVDIEKVMITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNLC	584
hu.53	DDEEKFFPMHGTLIFGKEGTNA---TNAELNVMI TDEEEIRTTNPVATEQYGYVSNLNC	583

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

AAV1	SSS#TDPATGDVHAMGALPGMVWQDRDVYLGQPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKH-PPP	645
AAV2	RGN#RQAATADVNTQGVLPGMVWQDRDVYLGQPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKH-PPP	644
AAV3	SSN#TAPTTGTVNHQCALPGMVWQDRDVYLGQPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKH-PPP	645
AAV3-3	SSN#TAPTTGTVNHQCALPGMVWQDRDVYLGQPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKH-PPP	645
AAV3B	SSN#TAPTTGTVNHQCALPGMVWQDRDVYLGQPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKH-PPP	645
AAV4	SNS#NLPTVDRLTALGAVPGMVWQNRDIYYQGPWAKIPHTDGHFHPSPLIGGFGLKH-PPP	643
AAV4-4	SNS#NLPTVDRLTALGAVPGMVWQNRDIYYQGPWAKIPHTDGHFHPSPLIGGFGLKH-PPP	643
AAV5	SST#TAPATGTYNLQEI VPGSVMMERDVYLGQPIWAKIPETGAHFHPSAMGGFGLKH-PPP	634
AAV6	SSS#TDPATGDVHVMGALPGMVWQDRDVYLGQPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKH-PPP	645
AAV7	AAN#TAAQTQVNNQCALPGMVWQNRDVYLGQPIWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGLKH-PPP	646
AAV8	QQN#TAPQIGTVNSQCALPGMVWQNRDVYLGQPIWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGLKH-PPP	647
AAV9	SAQ#AQAQTGWVQNCILPGMVWQDRDVYLGQPIWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGMKH-PPP	645
AAV9e	SDG#AQAQTGWVQNCILPGMVWQDRDVYLGQPIWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGMKH-PPP	645
AAVrh10	QQN#AAPIVGAVNSQCALPGMVWQNRDVYLGQPIWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGLKH-PPP	647
AAVrh20	QQN#AAPIVGAVNSQCALPGMVWQNRDVYLGQPIWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGLKH-PPP	647
rh.39	QTN#TGPVGNVNSQCALPGMVWQNRDVYLGQPIWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGLKH-PPP	647
rh.73	RQN#TAPIVGAVNSQCALPGMVWQNRDVYLGQPIWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGLKH-PPP	647
rh.74v1	QQN#AAPIVGAVNSQCALPGMVWQNRDVYLGQPIWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGLKH-PPP	647
rh.74v2	QQN#AAPIVGAVNSQCALPGMVWQNRDVYLGQPIWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGLKH-PPP	647
hu.12	NSN#TGPPTENVNHQCALPGMVWQDRDVYLGQPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKH-PPP	644
hu.21	SGN#TQAATSDVNTQGVLPGMVWQDRDVYLGQPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKH-PPP	644
hu.26	SGN#TQAATSDVNTQGVLPGMVWQDRDVYLGQPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKH-PPP	644
hu.37	QTN#TGPVGNVNSQCALPGMVWQNRDVYLGQPIWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGLKH-PPP	647
hu.51	RGN#RQAATADVNTQGVLPGMVWQDRDVYLGQPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKH-PPP	645
hu.53	NSN#TAASTETVNHQCALPGMVWQDRDVYLGQPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKH-PPP	644

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

AAV1	QILIKNTPVPANPFAEFSATKFAFITQYSTGQVSVVEIEWELQKENS	KRWNPEVQYTSNY	705
AAV2	QILIKNTPVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVVEIEWELQKENS	KRWNPEIQYTSNY	704
AAV3	QIMIKNTPVPANPPTTFSPAKFASFITQYSTGQVSVVEIEWELQKENS	KRWNPEIQYTSNY	705
AAV3-3	QIMIKNTPVPANPPTTFSPAKFASFITQYSTGQVSVVEIEWELQKENS	KRWNPEIQYTSNY	705
AAV3B	QIMIKNTPVPANPPTTFSPAKFASFITQYSTGQVSVVEIEWELQKENS	KRWNPEIQYTSNY	705
AAV4	QIFLIKNTFPVPANPATTFSSTPVSNSFITQYSTGQVSVQIDWELQKERS	KRWNPEVQFTSNY	703
AAV4-4	QIFLIKNTFPVPANPATTFSSTPVSNSFITQYSTGQVSVQIDWELQKERS	KRWNPEVQFTSNY	703
AAV5	MMLIKNTPVPGNI-TSESDVVPVSSFITQYSTGQVTVEMEWELKKENS	KRWNPEIQYTNNY	693
AAV6	QILIKNTPVPANPFAEFSATKFAFITQYSTGQVSVVEIEWELQKENS	KRWNPEVQYTSNY	705
AAV7	QILIKNTPVPANPPEVFPFAKFASFITQYSTGQVSVVEIEWELQKENS	KRWNPEIQYTSNF	706
AAV8	QILIKNTPVPADPPTTTFNQSKLNSFITQYSTGQVSVVEIEWELQKENS	KRWNPEIQYTSNY	707
AAV9	QILIKNTPVPADPPTAFNKDKLNSFITQYSTGQVSVVEIEWELQKENS	KRWNPEIQYTSNY	705
AAV9e	QILIKNTPVPADPPTAFNKDKLNSFITQYSTGQVSVVEIEWELQKENS	KRWNPEIQYTSNY	705
zh.10	QILIKNTPVPADPPTTFSQAKLASFITQYSTGQVSVVEIEWELQKENS	KRWNPEIQYTSNY	707
zh.20	QILIKNTPVPADPPTTFSQAKLASFITQYSTGQVSVVEIEWELQKENS	KRWNPEIQYTSNY	707
zh.39	QILIKNTPVPADPPTTFSQAKLASFITQYSTGQVSVVEIEWELQKENS	KRWNPEIQYTSNY	707
zh.73	QILIKNTPVPADPPTAFNQAKLNSFITQYSTGQVSVVEIEWELQKENS	KRWNPEIQYTSNY	707
zh.74v1	QILIKNTPVPADPPTTFTKAKLASFITQYSTGQVSVVEIEWELQKENS	KRWNPEIQYTSNY	707
zh.74v2	QILIKNTPVPADPPTTFNQAKLASFITQYSTGQVSVVEIEWELQKENS	KRWNPEIQYTSNY	707
hu.12	QIMIKNTPVPANPPTTFSSAKFASFITQYSTGQVSVVEIEWELQKENS	KRWNPEIQYTSNY	704
zh.21	QILIKNTPVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVVEIEWELQKENS	KRWNPEIQYTSNY	704
hu.26	QILIKNTPVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVVEIEWELQKENS	KRWNPEIQYTSNY	704
hu.37	QILIKNTPVPADPPTTFSQAKLASFITQYSTGQVSVVEIEWELQKENS	KRWNPEIQYTSNY	707
hu.51	QILIKNTPVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVVEIEWELQKENS	KRWNPEIQYTSNY	705
hu.53	QIMIKNTPVPANPPTTFSSAKFASFITQYSTGQVSVVEIEWELQKENS	KRWNPEIQYTSNY	704

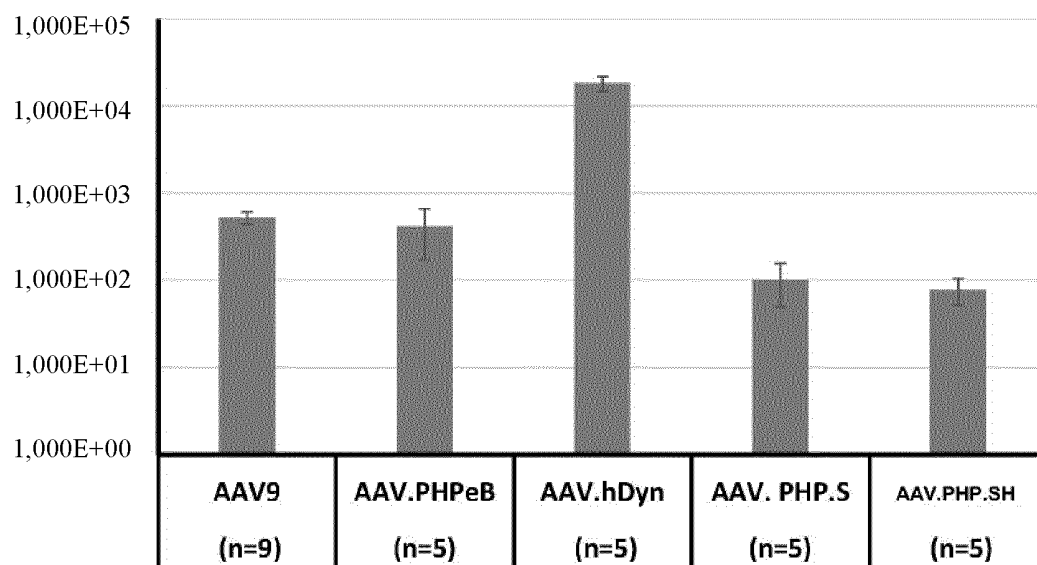
::*****.: * . *****:*.::*:*:*.*.*****:*.::*.*:

AAV1	AKSANVDFTVDNNGLYTEPRPIGTRYLTRPL	736 (SEQ ID NO: 59)
AAV2	NKSVNVDFTVDTNQVYSEPRPIGTRYLTRNL	735 (SEQ ID NO: 60)
AAV3	NKSVNVDFTVDTNQVYSEPRPIGTRYLTRNL	736 (SEQ ID NO: 61)
AAV3-3	NKSVNVDFTVDTNQVYSEPRPIGTRYLTRNL	736 (SEQ ID NO: 78)
AAV3B	NKSVNVDFTVDTNQVYSEPRPIGTRYLTRNL	736 (SEQ ID NO: 87)
AAV4	GQQNSLLWAPDAAGKYTEPRAICTRYLTHHL	734 (SEQ ID NO: 62)
AAV4-4	GQQNSLLWAPDAAGKYTEPRAICTRYLTHHL	734 (SEQ ID NO: 79)
AAV5	NDPQFVDFAPDSFCYRRTFRPIGTRYLTRPL	724 (SEQ ID NO: 63)
AAV6	AKSANVDFTVDNNGLYTEPRPIGTRYLTRPL	736 (SEQ ID NO: 64)
AAV7	EKQTVDFAVDSQGVYSEPRPIGTRYLTRNL	737 (SEQ ID NO: 65)
AAV8	YKSTNVDFAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL	738 (SEQ ID NO: 66)
AAV9	YKSNVDFAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL	736 (SEQ ID NO: 67)
AAV9c	YKSNVDFAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL	736 (SEQ ID NO: 68)
zh.10	YKSTNVDFAVNTEGTYSEPRPIGTRYLTRNL	738 (SEQ ID NO: 69)
zh.20	YKSTNVDFAVNTEGTYSEPRPIGTRYLTRNL	738 (SEQ ID NO: 70)
zh.39	YKSTNVDFAVNTEGTYSEPRPIGTRYLTRNL	738 (SEQ ID NO: 73)
zh.73	YKSTNVDFAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL	739 (SEQ ID NO: 88)
zh.74v1	YKSTNVDFAVNTEGTYSEPRPIGTRYLTRNL	738 (SEQ ID NO: 72)
zh.74v2	YKSTNVDFAVNTEGTYSEPRPIGTRYLTRNL	738 (SEQ ID NO: 80)
hu.12	NKSVNVDFTVDTNQVYSEPRPIGTRYLTRNL	735 (SEQ ID NO: 75)
hu.21	NKSVNVDFTVDTNQVYSEPRPIGTRYLTRNL	735 (SEQ ID NO: 74)
hu.26	NKSVNVDFTVDTNQVYSEPRPIGTRYLTRNL	735 (SEQ ID NO: 76)
hu.37	YKSTNVDFAVNTEGTYSEPRPIGTRYLTRNL	738 (SEQ ID NO: 71)
hu.51	NKSVNVDFTVDTNQVYSEPRPIGTRYLTRNL	736 (SEQ ID NO: 89)
hu.53	NKSVNVDFTVDTNQVYSEPRPIGTRYLTRNL	737 (SEQ ID NO: 77)

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

ФИГ. 8

Копии генома вектора /мкг геномной ДНК



ФИГ. 9А-9С ААV9- ТЛААРФК (SEQ ID NO: 1)

MAADGYLPDW	LEDNLSEGIR	EWWALKPGAP	QPKANQQHQD	NARGLVLPGY	KYLGPGNGLD	60
KGEPVNAADA	AALSHDKAYD	QQLKAGDNFY	LKYNHADAEF	QERLKEDTSF	GGNLGRAVFQ	120
AKKRLLEPLG	LVEEAAKTAP	GKKRPVEQSP	QEPDSSAGIG	KSGAQPAKRR	LNFGQTGDTE	180
SVPDFQPIGE	PPAAPSGVGS	LTMASGGGAP	VADNNEGADG	VGSSSGNWHC	DSQWLGDREVI	240
TTSTRTWALP	TYNNHLYKQI	SNSTSGGSSN	DNAYFGYSTP	WGYFDFNRFH	CHFSPRDWQR	300
LINNNWGFRP	KRLNFKLFNI	QVKEVTDNNG	VKTIANNLTS	TVQVFTDSY	QLPYVLGSAH	360
EGCLPFFPAD	VFMIPQYGYL	TLNDGSQAVG	RSSFYCLEYF	PSQMLRTGNN	QFQSYEFENV	420
PFHSSYAHSQ	SLDRMLNPLI	DQYLYLSKT	INGSGNQQT	LKFSVAGPSN	MAVQGRNYIP	480
GPSYRQQRVS	TTVTQNNNSE	FAWPGASSWA	LNGRNSLMNP	GPAMASHKEG	EDRFFPLSGS	540
LIPGKQGTGR	DNVDADKVM	TNEEBIKTTN	PVATESYGVQ	ATNHQSAQTL	AAPFKAQAQT	600
GWVQNQGILP	GMVWQDRDVI	LQGPWAKIP	HTDGNFHESP	LMGGFGMKHP	PPQILIKNTP	660
VPADEPTAFN	KDKLNSFITQ	YSTGQVSVEI	EWELQKENS	RWNPEIQYTS	NYKSNVVEF	720
AVNTEGVYSE	PRPIGTRYLT	RNL (SEQ ID NO: 125)				

ФИГ. 9А (ТЛААРФК (SEQ ID NO: 1) ВСТАВКА МЕЖДУ Q588 И A589)

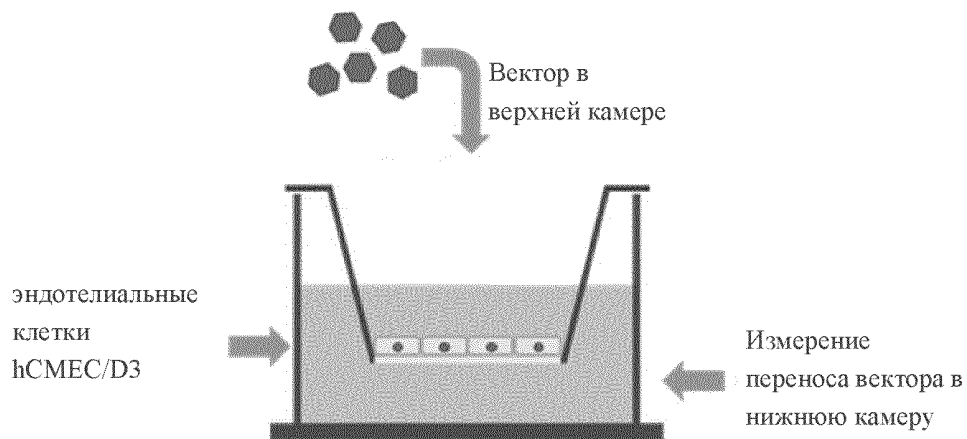
MAADGYLPDW	LEDNLSEGIR	EWWALKPGAP	QPKANQQHQD	NARGLVLPGY	KYLGPGNGLD	60
KGEPVNAADA	AALSHDKAYD	QQLKAGDNFY	LKYNHADAEF	QERLKEDTSF	GGNLGRAVFQ	120
AKKRLLEPLG	LVEEAAKTAP	GKKRPVEQSP	QEPDSSAGIG	KSGAQPAKRR	LNFGQTGDTE	180
SVPDFQPIGE	PPAAPSGVGS	LTMASGGGAP	VADNNEGADG	VGSSSGNWHC	DSQWLGDREVI	240
TTSTRTWALP	TYNNHLYKQI	SNSTSGGSSN	AAPFKSNDNA	YFGYSTPWGY	FDNRFHCHF	300
SPRDWQRLIN	NNWGFRPKRL	NFKLFNIQVK	EVTDNNGVKT	IANNLTSTVQ	VFTDSYQLP	360
YVLGSAHEGC	LPPFPADVFM	IPQYGYLTLN	DGSQAVGRSS	FYCLEYPPSQ	MLRTGNPFQF	420
SYEFENVPPH	SSYAHSQSLD	RLMNLIDQY	LYLSKTING	SGQNQQTLKF	SVAGPSNMAV	480
QGRNYIPGFS	YRQQRVSTTV	TQNNSEFAW	PGASSWALNG	RNSLMNPGPA	MASHKEGEDR	540
FFPLSGSLIF	GKQGTGRDNV	DADKVMITNE	EEIKTTFNVA	TESYGVQVATN	HQSAQAQAQT	600
GWVQNQGILP	GMVWQDRDVI	LQGPWAKIP	HTDGNFHESP	LMGGFGMKHP	PPQILIKNTP	660
VPADEPTAFN	KDKLNSFITQ	YSTGQVSVEI	EWELQKENS	RWNPEIQYTS	NYKSNVVEF	720
AVNTEGVYSE	PRPIGTRYLT	RNL (SEQ ID NO: 126)				

ФИГ. 9В (ТЛААРФК (SEQ ID NO: 1) ВСТАВКА МЕЖДУ S268 И S269)

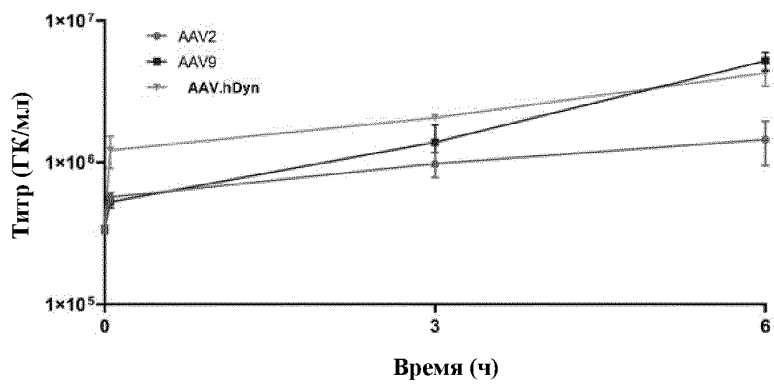
MAADGYLPDW	LEDNLSEGIR	EWWALKPGAP	QPKANQQHQD	NARGLVLPGY	KYLGPGNGLD	60
KGEPVNAADA	AALSHDKAYD	QQLKAGDNFY	LKYNHADAEF	QERLKEDTSF	GGNLGRAVFQ	120
AKKRLLEPLG	LVEEAAKTAP	GKKRPVEQSP	QEPDSSAGIG	KSGAQPAKRR	LNFGQTGDTE	180
SVPDFQPIGE	PPAAPSGVGS	LTMASGGGAP	VADNNEGADG	VGSSSGNWHC	DSQWLGDREVI	240
TTSTRTWALP	TYNNHLYKQI	SNSTSGGSSN	DNAYFGYSTP	WGYFDFNRFH	CHFSPRDWQR	300
LINNNWGFRP	KRLNFKLFNI	QVKEVTDNNG	VKTIANNLTS	TVQVFTDSY	QLPYVLGSAH	360
EGCLPFFPAD	VFMIPQYGYL	TLNDGSQAVG	RSSFYCLEYF	PSQMLRTGNN	QFQSYEFENV	420
PFHSSYAHSQ	SLDRMLNPLI	DQYLYLSKT	INGST TLAAPF	KGQNQQTLKF	SVAGPSNMAV	480
QGRNYIPGFS	YRQQRVSTTV	TQNNSEFAW	PGASSWALNG	RNSLMNPGPA	MASHKEGEDR	540
FFPLSGSLIF	GKQGTGRDNV	DADKVMITNE	EEIKTTFNVA	TESYGVQVATN	HQSAQAQAQT	600
GWVQNQGILP	GMVWQDRDVI	LQGPWAKIP	HTDGNFHESP	LMGGFGMKHP	PPQILIKNTP	660
VPADEPTAFN	KDKLNSFITQ	YSTGQVSVEI	EWELQKENS	RWNPEIQYTS	NYKSNVVEF	720
AVNTEGVYSE	PRPIGTRYLT	RNL (SEQ ID NO: 127)				

ФИГ. 9С (ТЛААРФК (SEQ ID NO:1) ВСТАВКА МЕЖДУ S454 И G455)

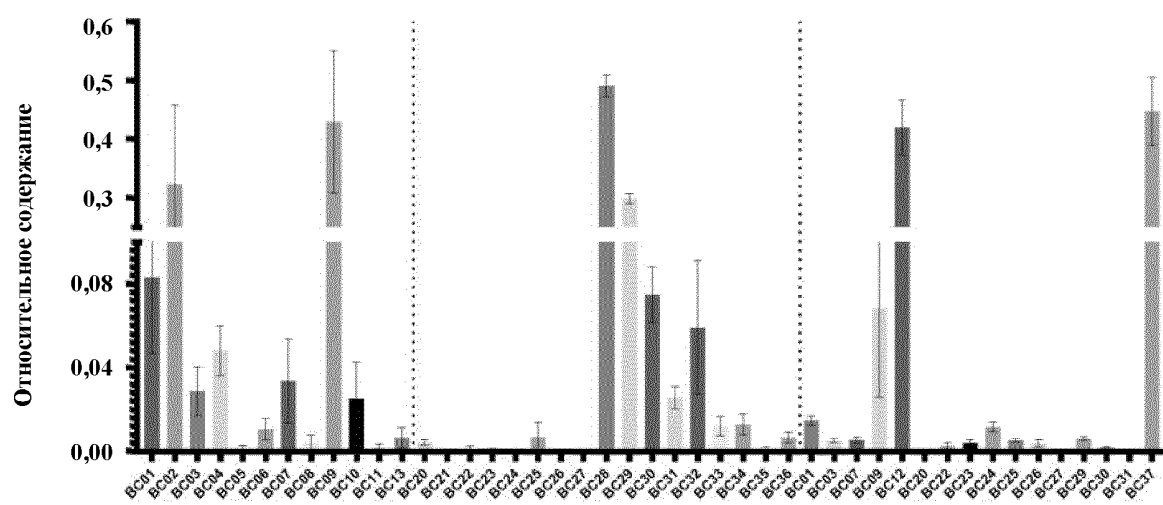
ФИГ. 10А-10В



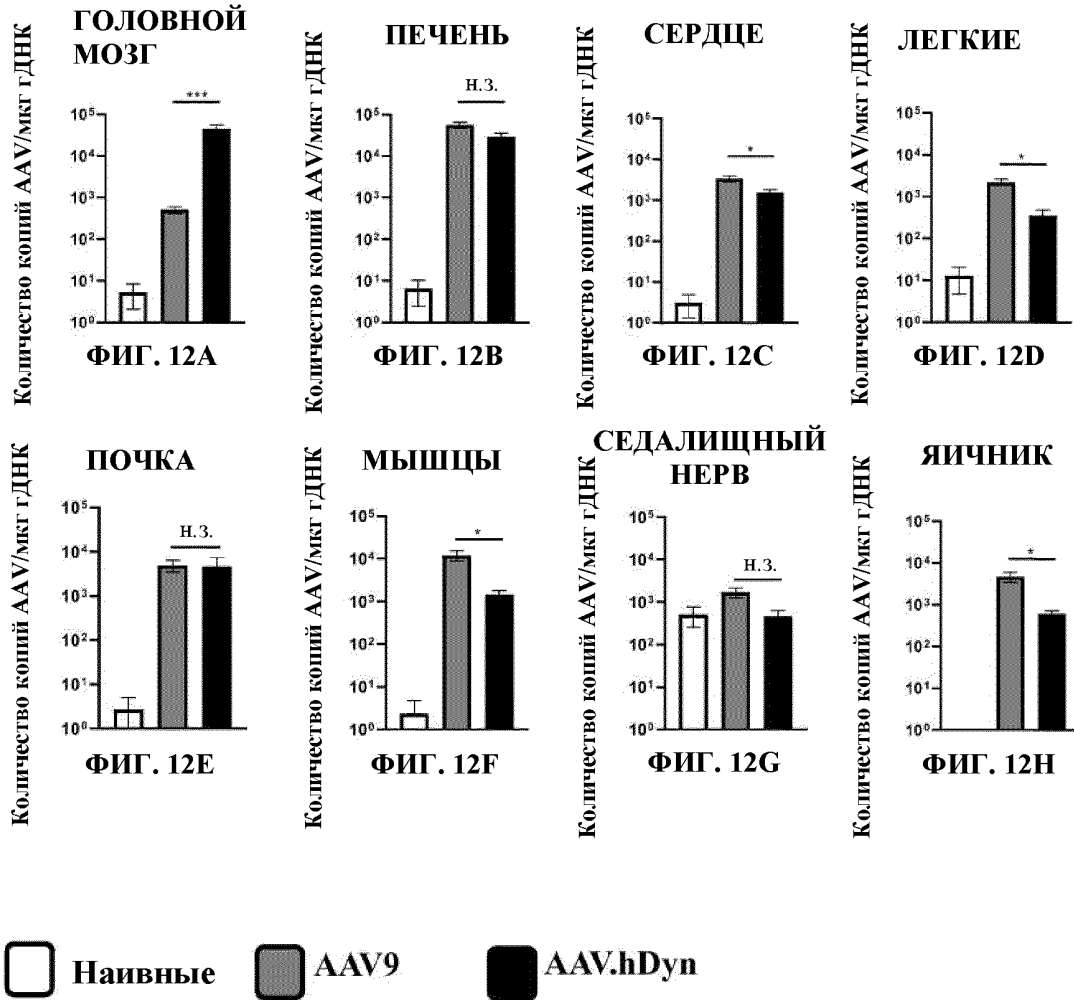
ФИГ. 10А



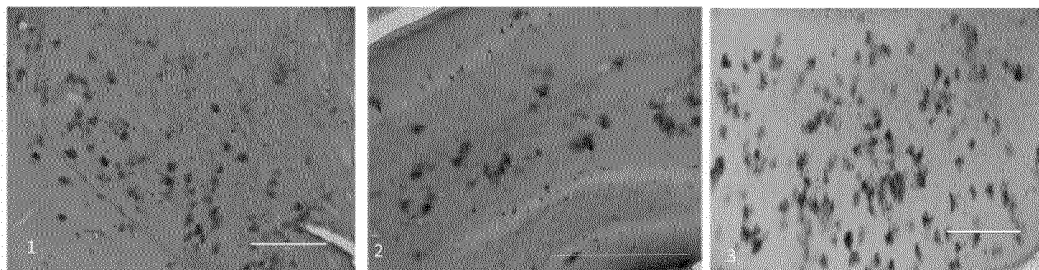
ФИГ. 10В



ФИГ. 12А-12Н



ФИГ. 13А-13С

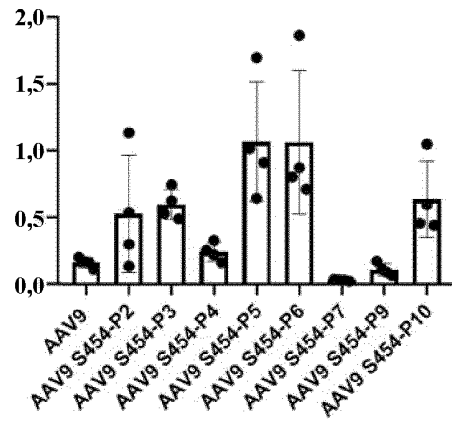


ФИГ. 13А

ФИГ. 13В

FIG.13С

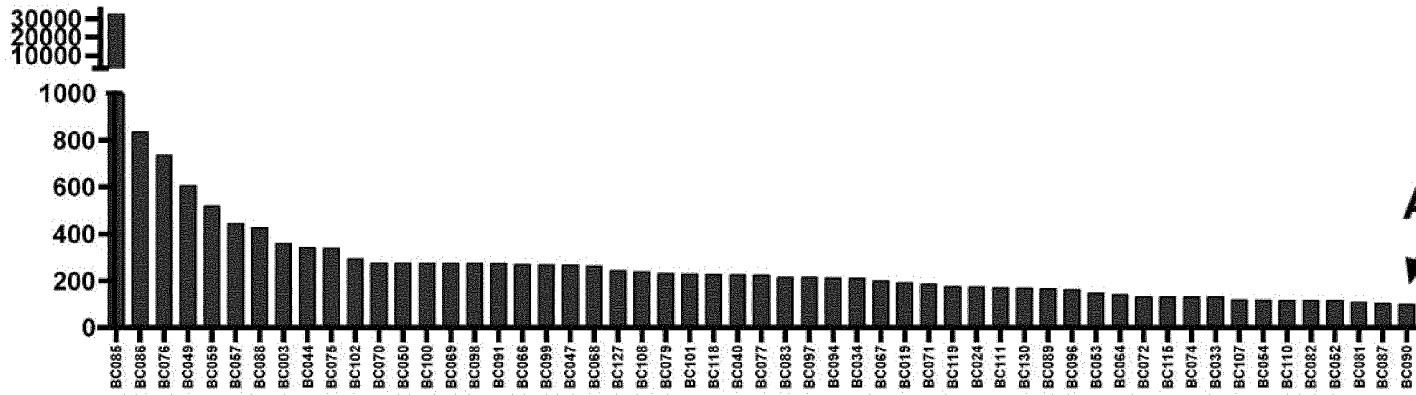
Соотношение трансдукции почек и печени



ФИГ. 14

ФИГ. 15

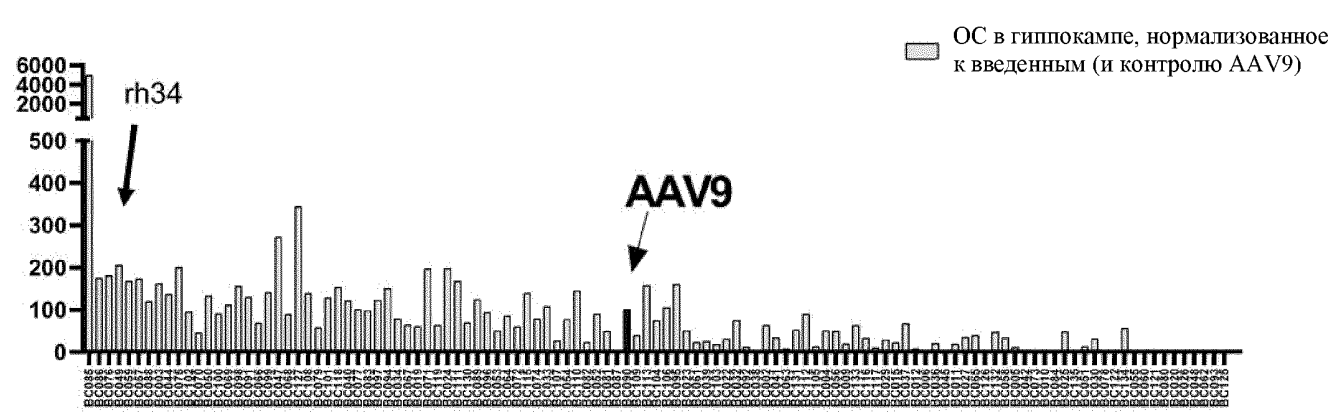
ОС, нормализованное к контролю (% контроля)

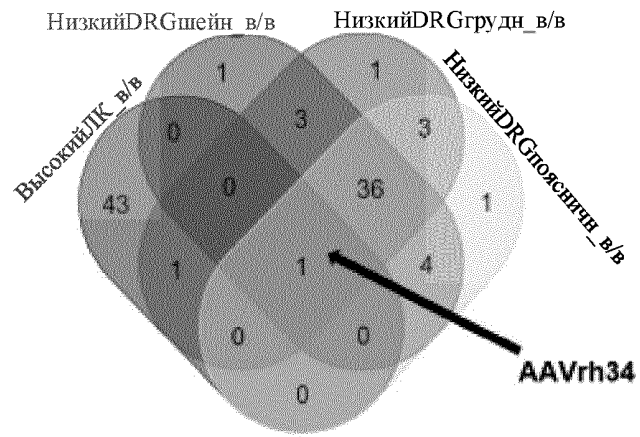


Лобная кора: Относительное содержание (ОС),
нормализованное к введенным (и контролю AAV9)
[NHP в/в ДНК-ЦНС]

AAV9

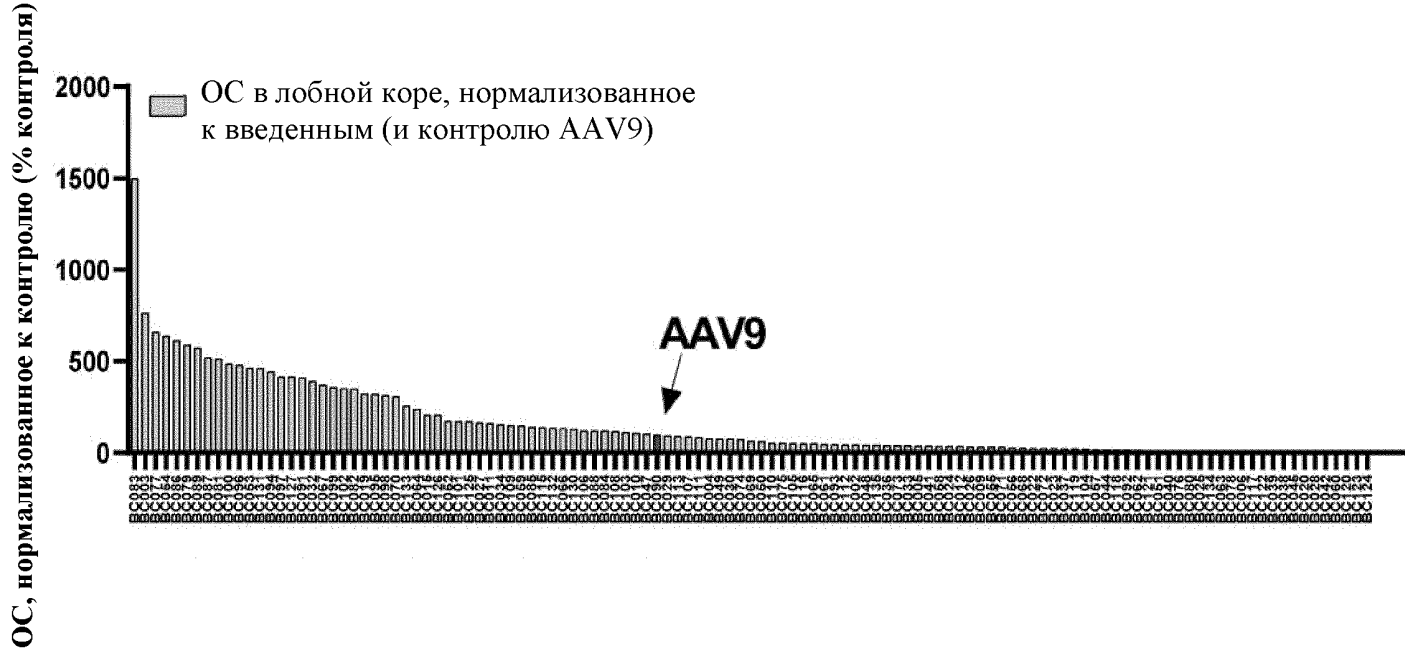
ФИГ. 16
ОС, нормализованное к контролю (% контроля)





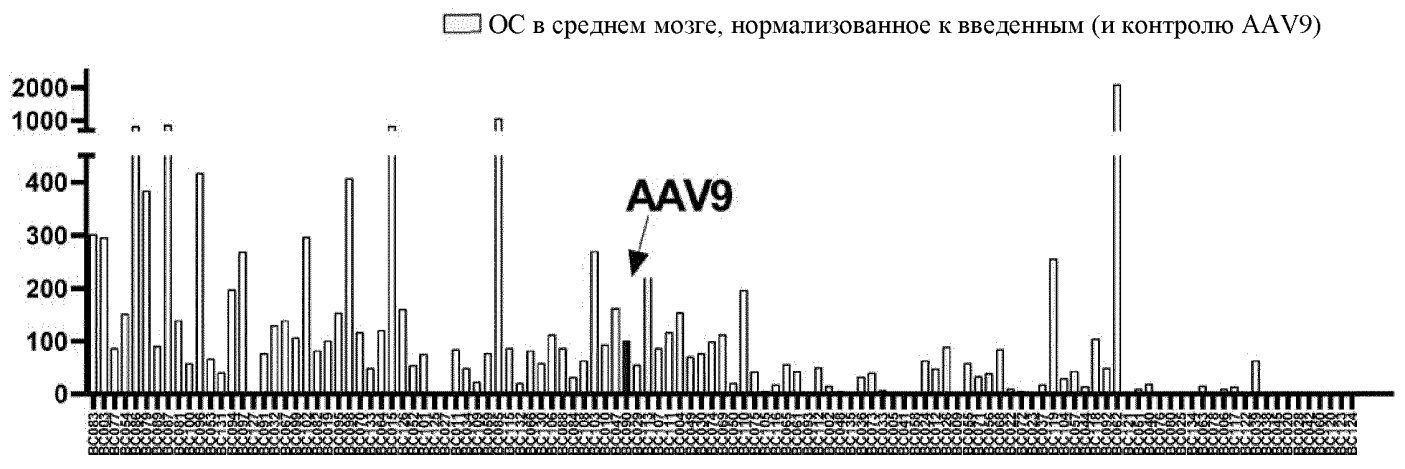
ФИГ. 18

ФИГ. 19

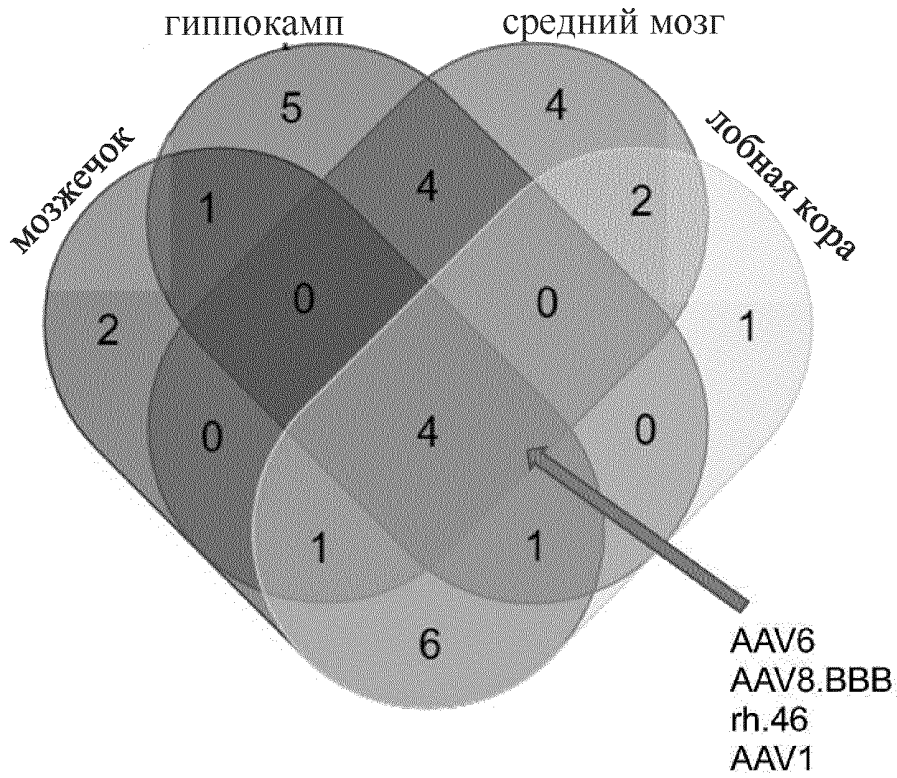


ФИГ. 21

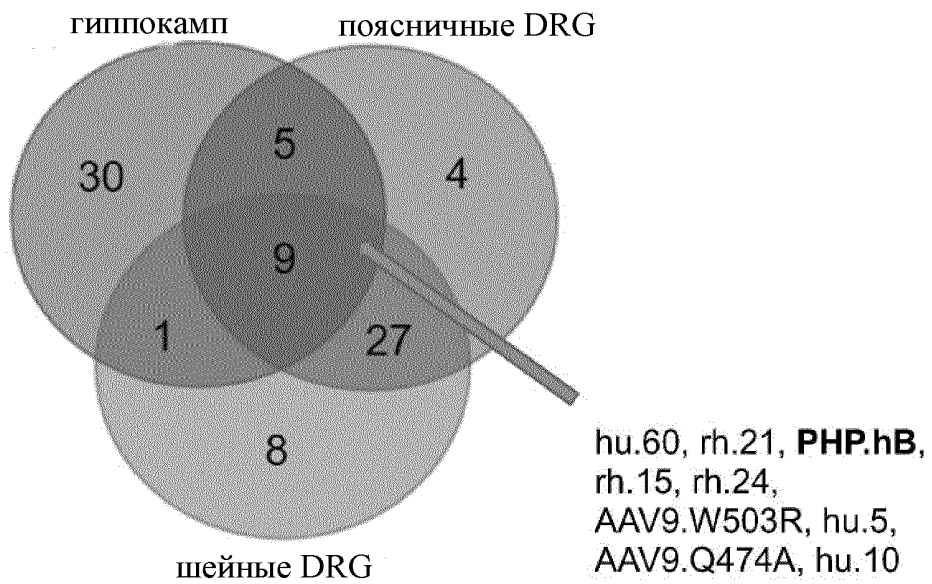
ОС, нормализованное к контролю (% контроля)



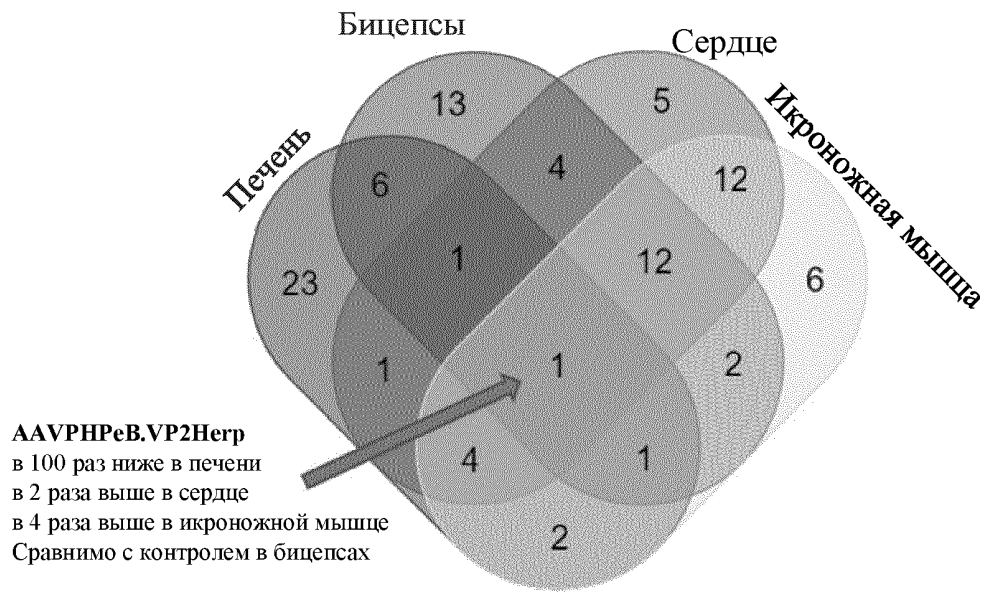
31/45



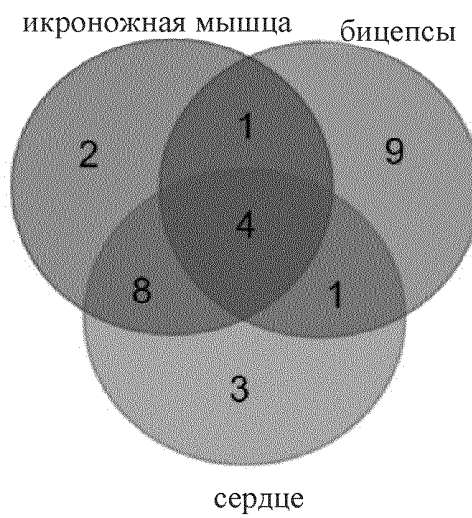
ФИГ. 25



ФИГ. 26

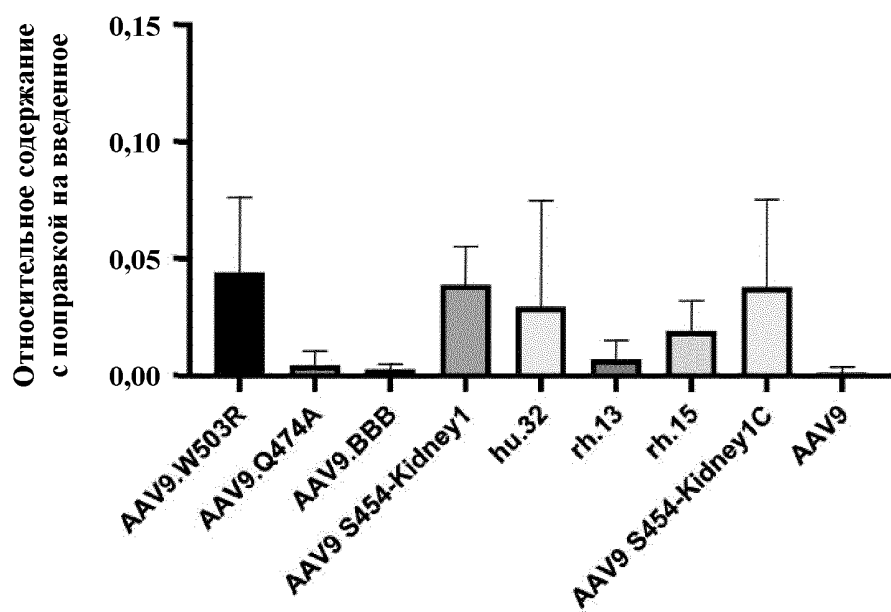


ФИГ. 27

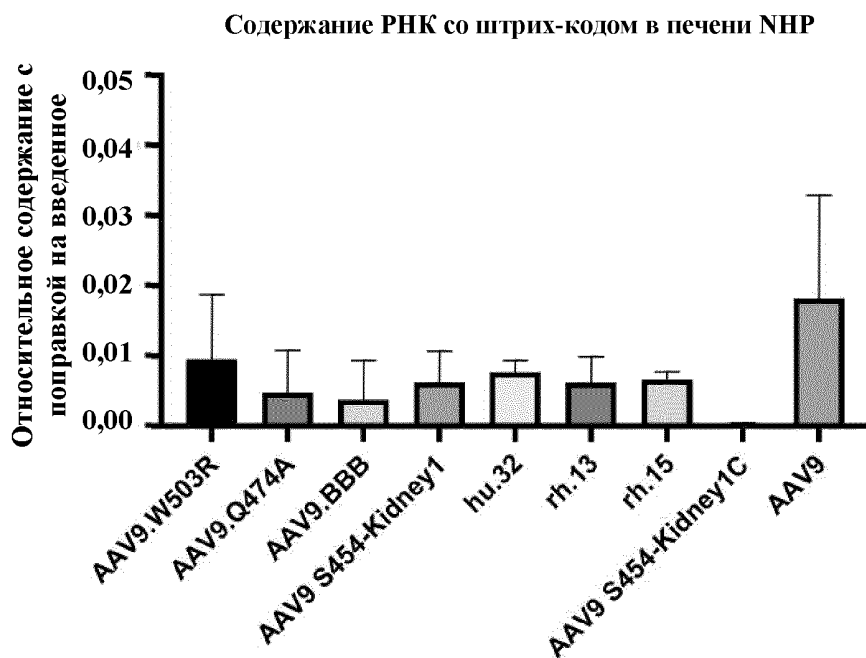


ФИГ. 28

Содержание РНК со штрих-кодом в икроножной мышце ННР

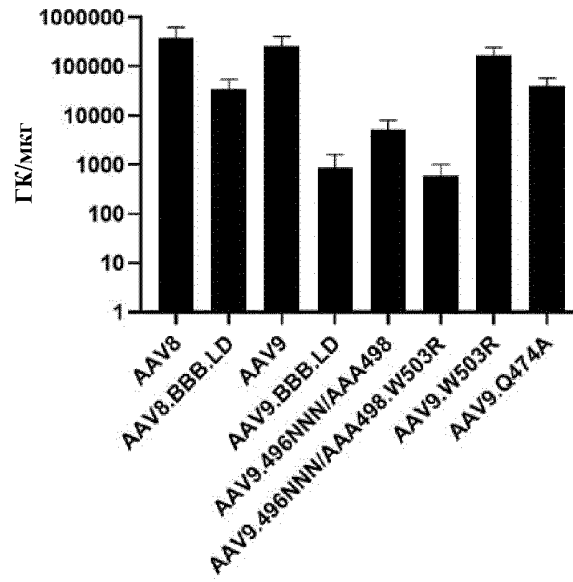


ФИГ. 29А



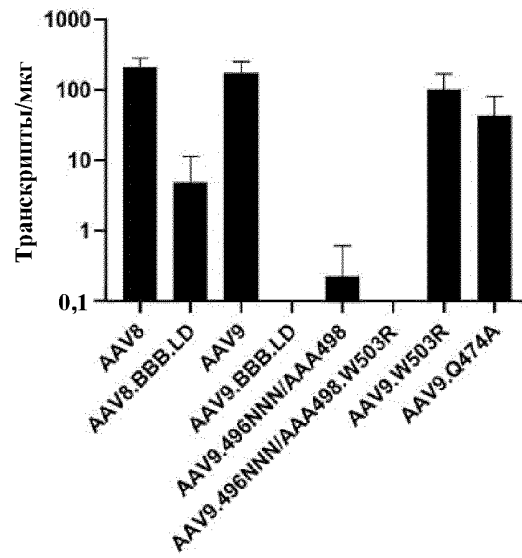
ФИГ. 29В

ДНК печени NHP

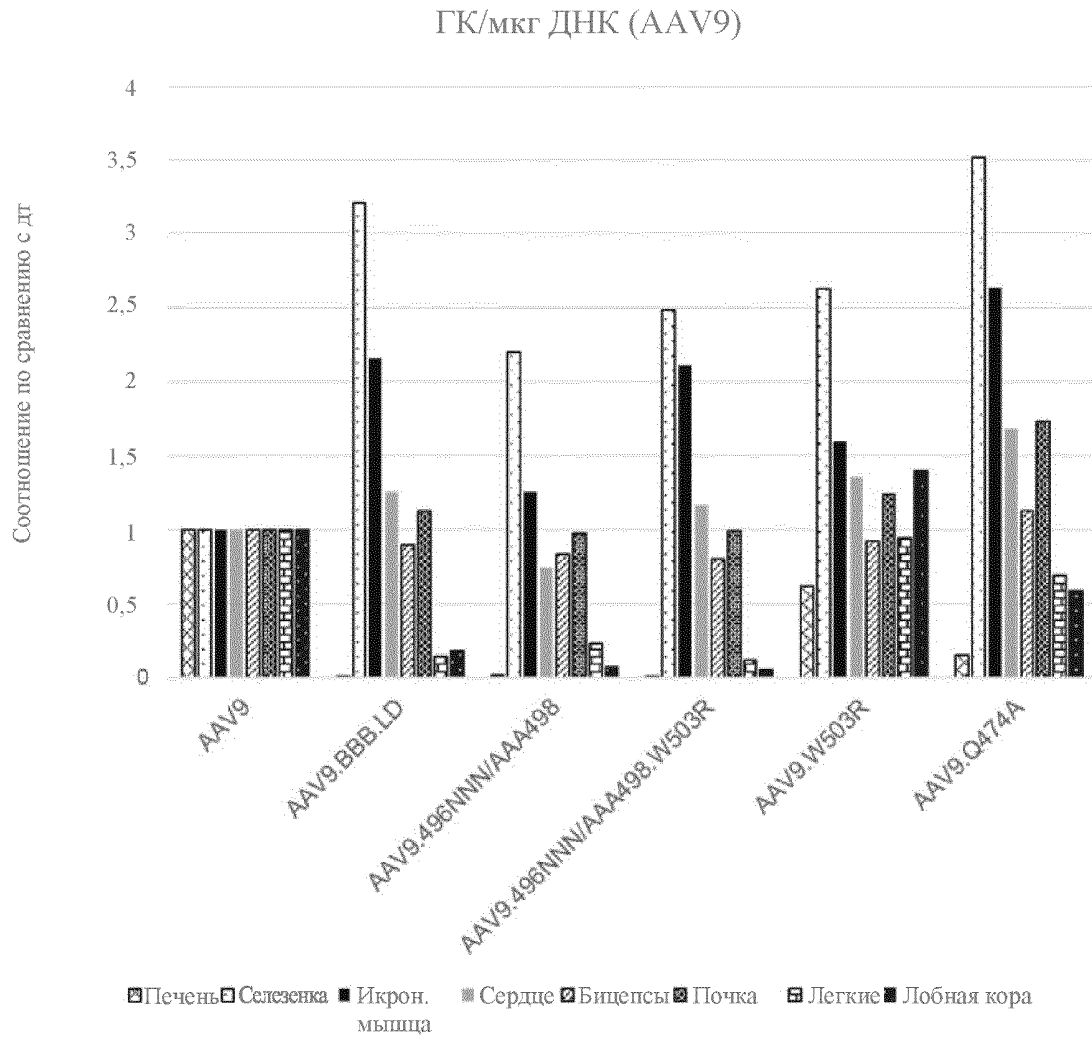


ФИГ. 30А

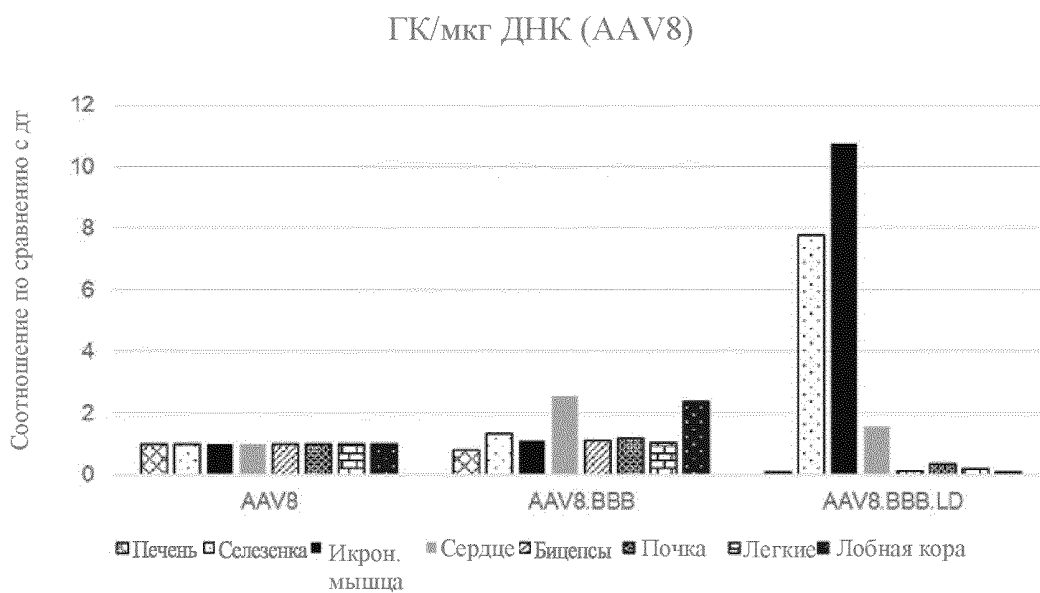
РНК печени NHP



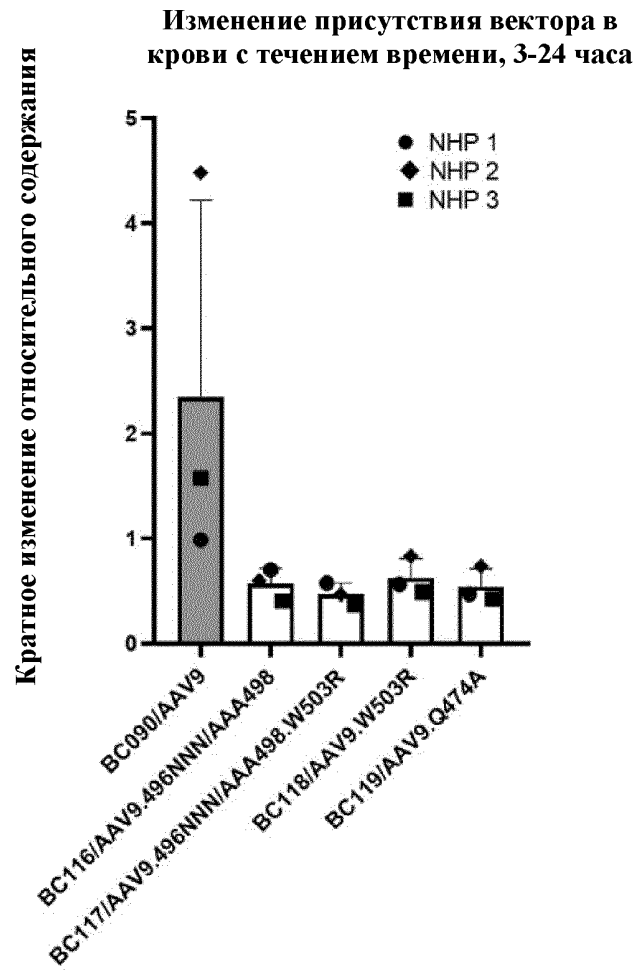
ФИГ. 30В



ФИГ. 31

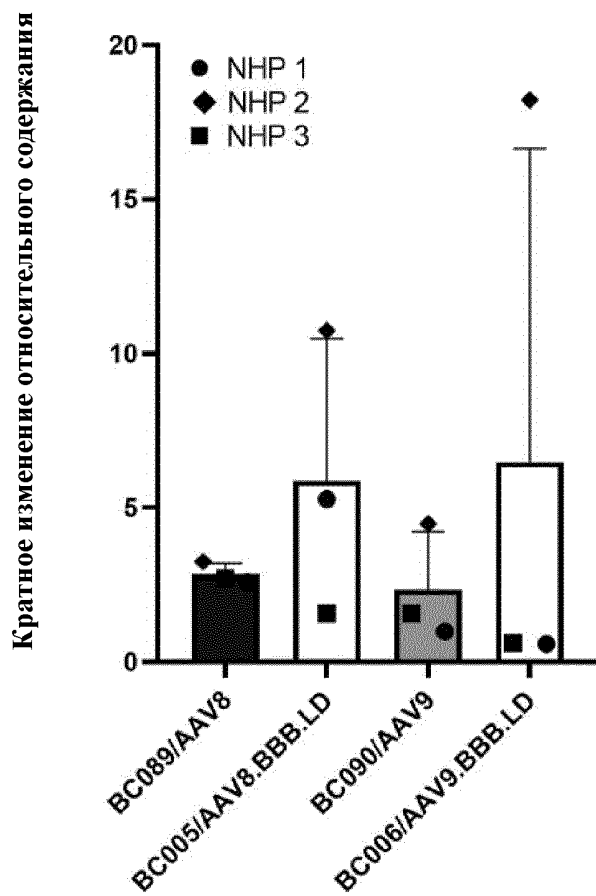


ФИГ. 32



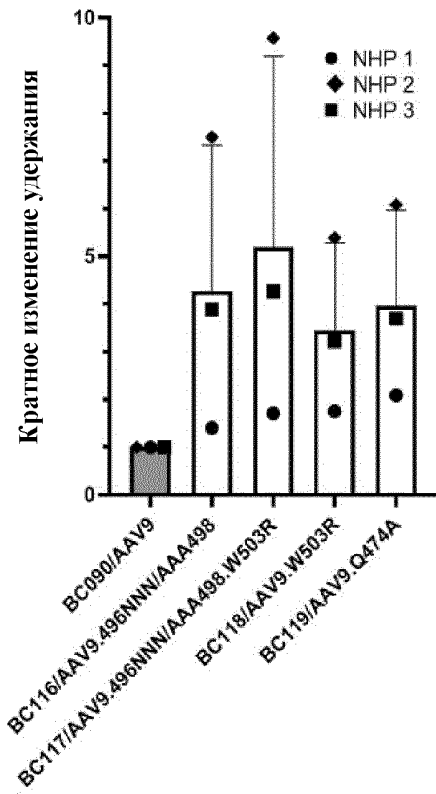
ФИГ. 33А

Изменение присутствия вектора в
крови с течением времени, 3-24 часа



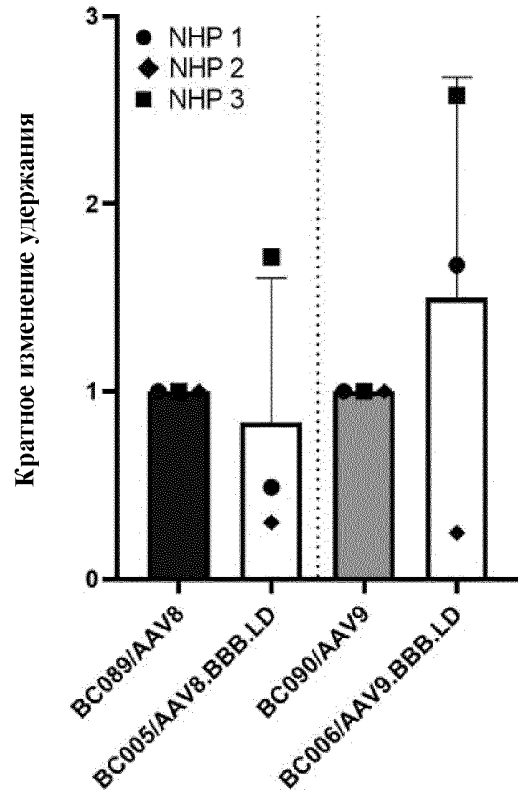
ФИГ. 33В

Увеличение удержания в крови
3-24 часа по сравнению с AAV9



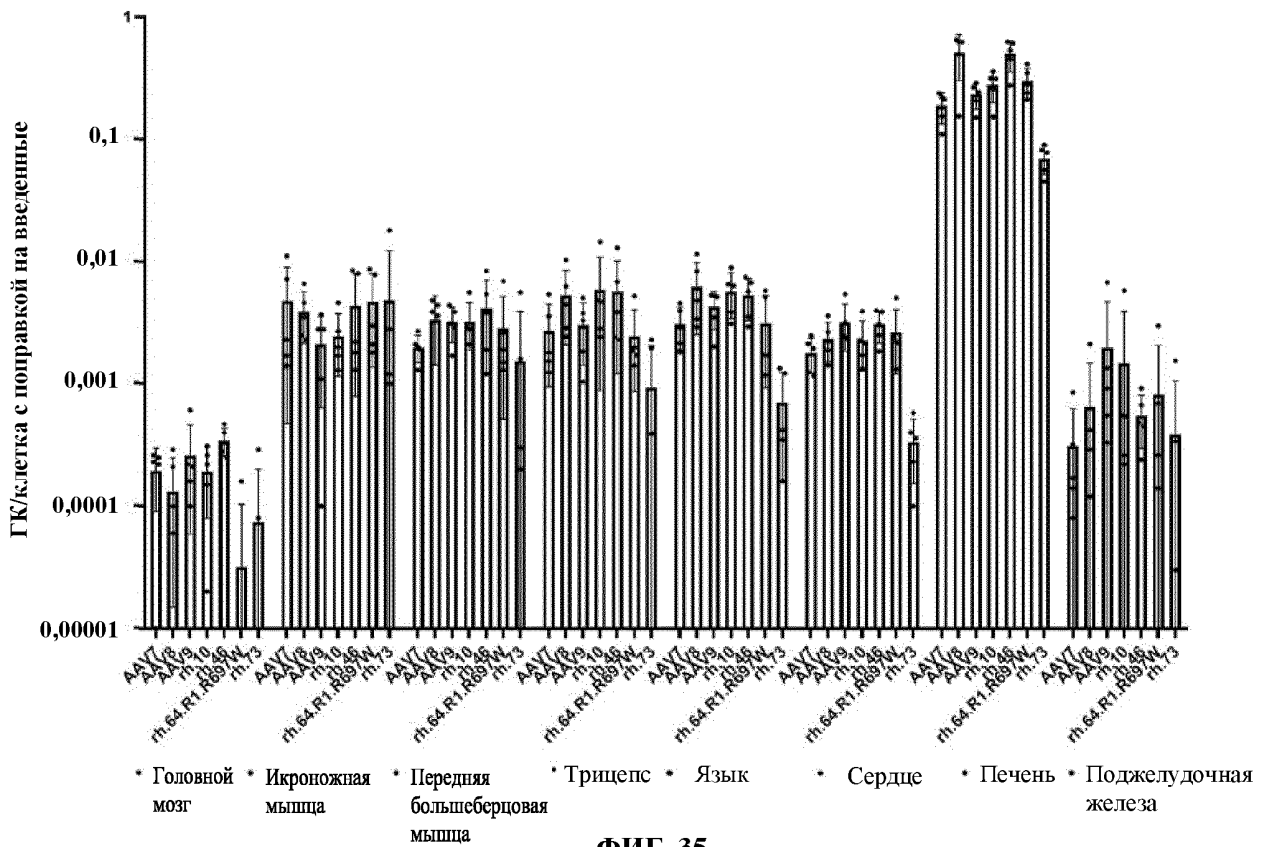
ФИГ. 34А

Увеличение удержания в крови 3-24
часа по сравнению с исходным AAV



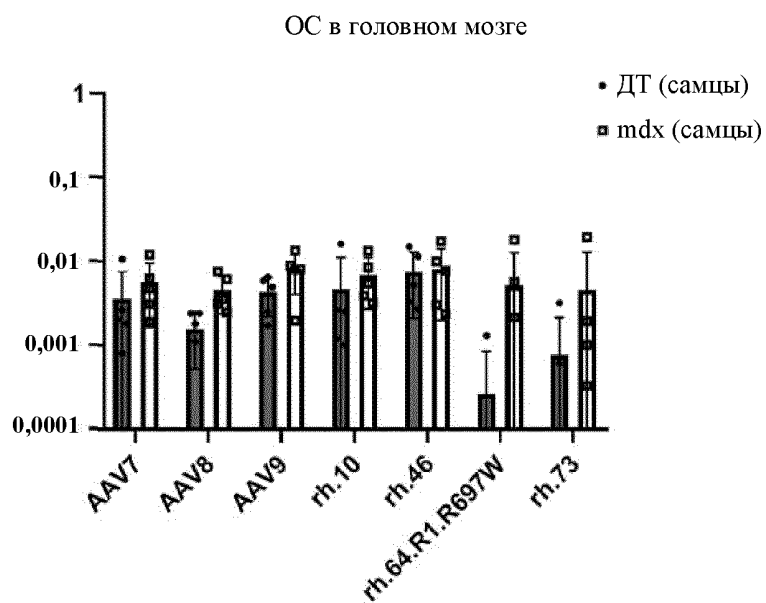
ФИГ. 34В

Биораспределение (с поправкой на введенные) векторов со штрих-кодами у самцов мышей В6 дикого типа после в/в введения



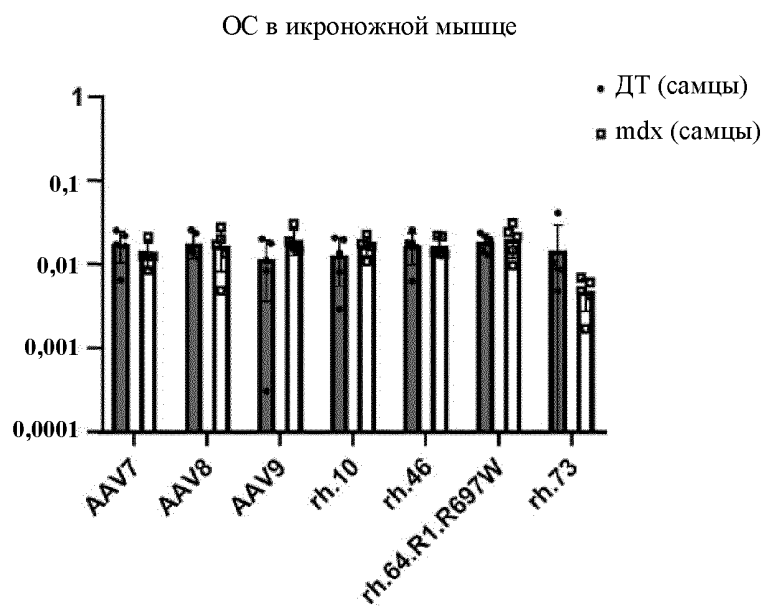
ФИГ. 35

Относительное содержание с поправкой
на введенное

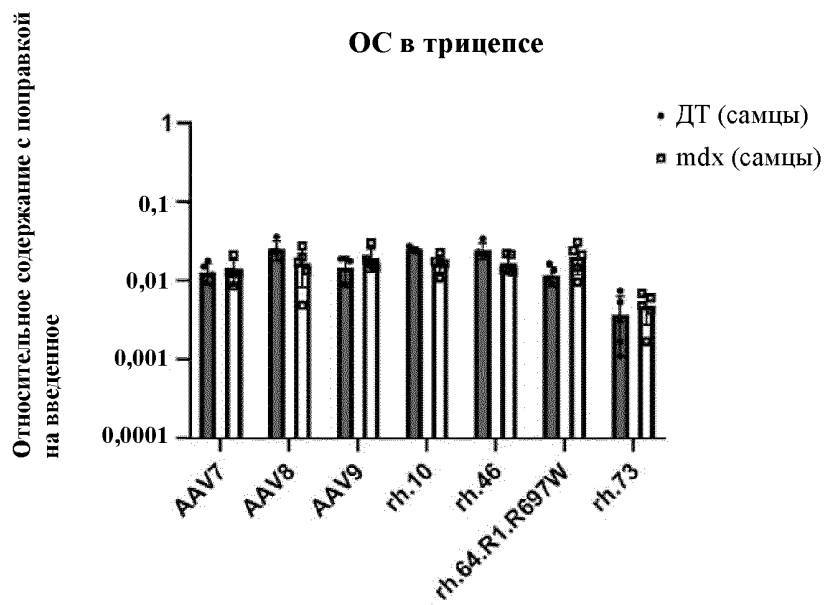


ФИГ. 36А

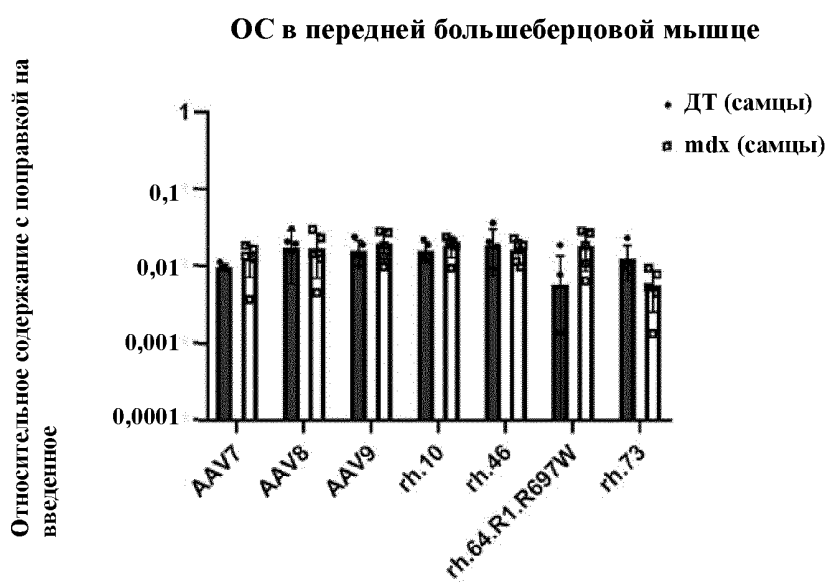
Относительное содержание с поправкой
на введенное



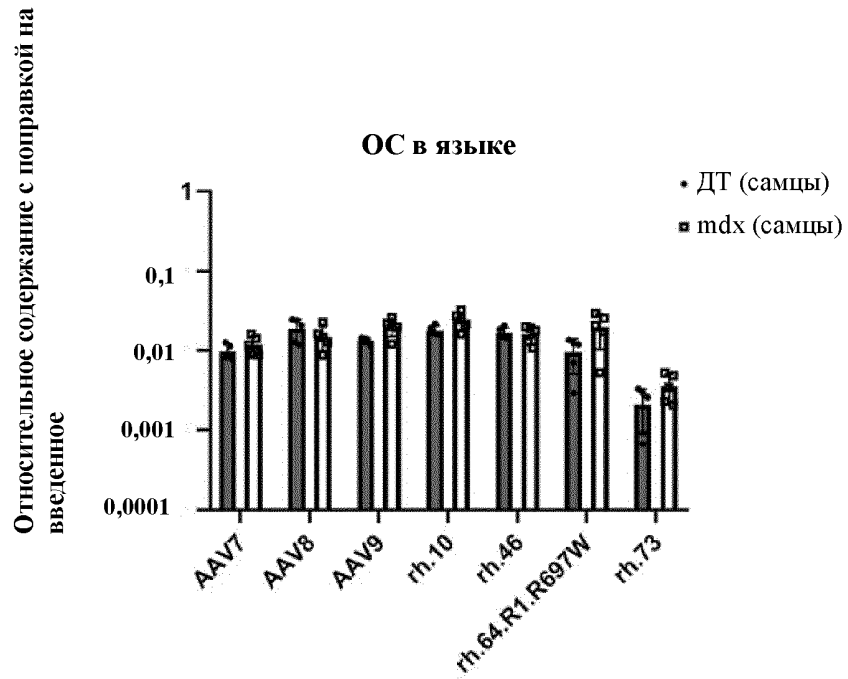
ФИГ. 36В



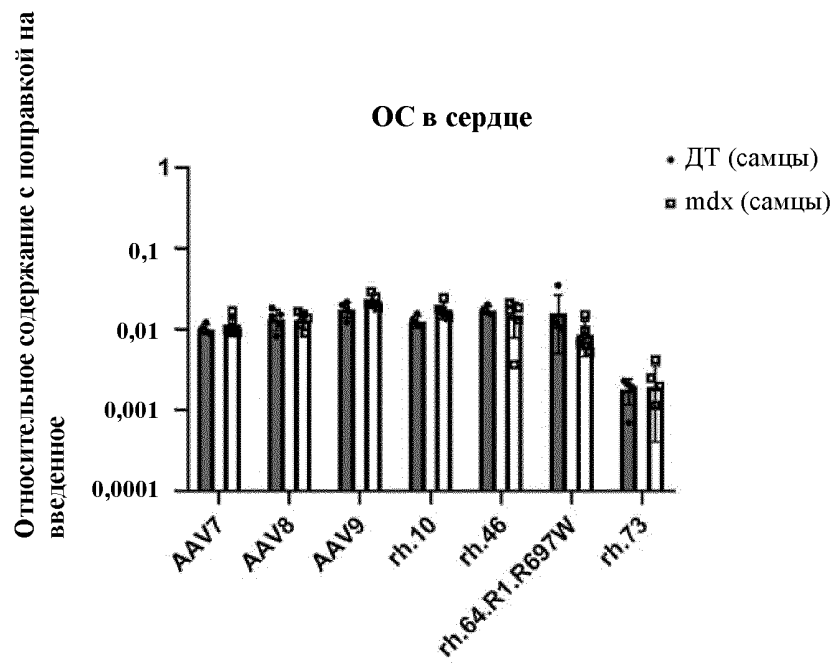
ФИГ. 36С



ФИГ. 36D

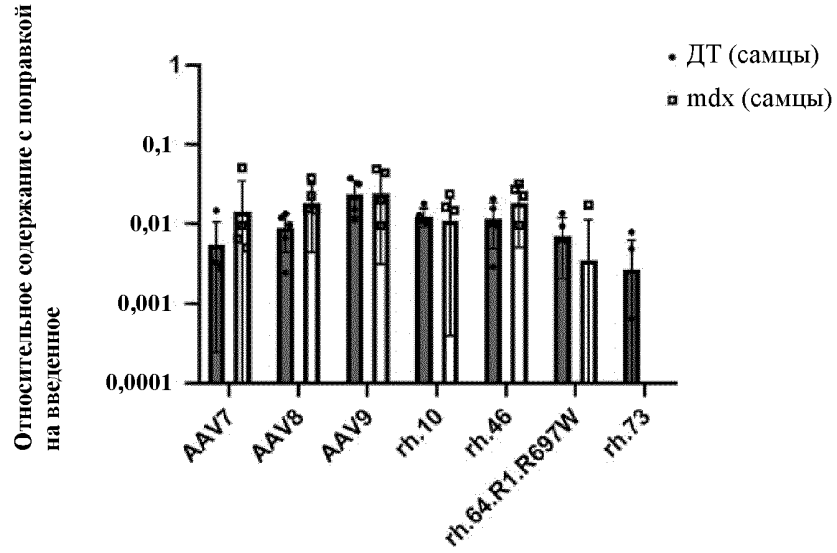


ФИГ. 36Е



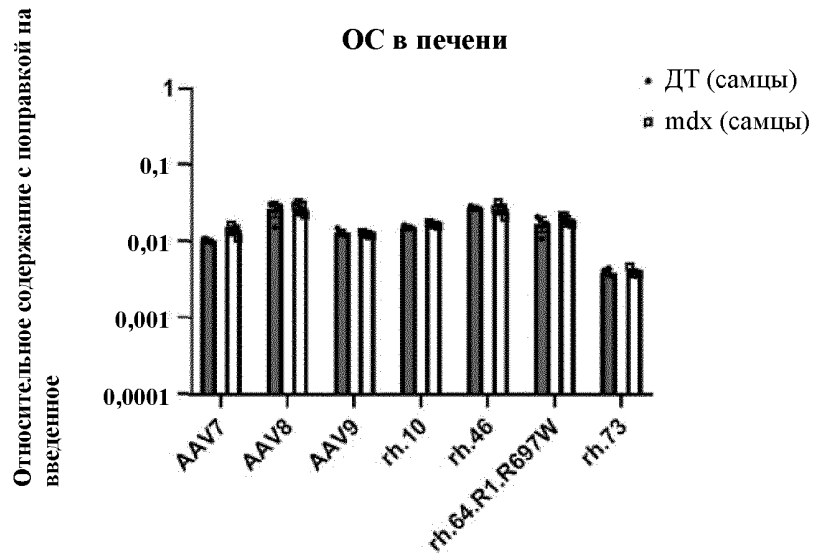
ФИГ. 36F

ОС в поджелудочной железе



ФИГ. 36G

ОС в печени



ФИГ. 36H