

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202391126** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.08.31

(22) Дата подачи заявки
2021.10.18

(51) Int. Cl. *C07K 14/47* (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)
C07K 16/22 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)

(54) НУКЛЕИНОВАЯ КИСЛОТА, КОДИРУЮЩАЯ МОЛЕКУЛУ ПРОТИВ VEGF И НЕГАТИВНЫЙ РЕГУЛЯТОР КОМПЛЕМЕНТА, И ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ВОЗРАСТНОЙ МАКУЛОДИСТРОФИИ

(31) 2016463.8; 2104148.8

(32) 2020.10.16; 2021.03.24

(33) GB

(86) PCT/GB2021/052689

(87) WO 2022/079453 2022.04.21

(71) Заявитель:
**ДЖИРОСКОУП ТЕРАПЬЮТИКС
ЛИМИТЕД (GB)**

(72) Изобретатель:
**Джозел Джозефин, Эстив-Радд
Джулиан, Тэм Лоуренс, Эллис Скотт
(GB)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к продукту, включающему (i) молекулу против VEGF; и (ii) негативный регулятор комплемента, или нуклеотидные последовательности, кодирующие их, в виде комбинированного препарата для одновременного, отдельного или последовательного применения в терапии. В частности, молекула против VEGF представляет собой антитело против VEGF, предпочтительно афлиберцепт, а негативный регулятор комплемента представляет собой фактор комплемента I (CFI) или фактор комплемента H-подобный белок 1 (FHL1). Основные применения включают лечение заболеваний глаз, в частности возрастной макулодистрофии (ВМД).

A1

202391126

202391126

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-577913EA/061

НУКЛЕИНОВАЯ КИСЛОТА, КОДИРУЮЩАЯ МОЛЕКУЛУ ПРОТИВ VEGF И НЕГАТИВНЫЙ РЕГУЛЯТОР КОМПЛЕМЕНТА, И ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ВОЗРАСТНОЙ МАКУЛОДИСТРОФИИ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящее изобретение относится к средствам для применения в генотерапии. В частности, изобретение относится к комбинациям молекулы против VEGF и негативного регулятора комплемента, или нуклеотидным последовательностям, кодирующим их, а также к их применению при лечении или профилактике комплемент-опосредованных и комплемент-ассоциированных заболеваний, в том числе комплемент-опосредованных заболеваний глаз, таких как возрастная макулодистрофия (ВМД).

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Желтое пятно представляет собой небольшой участок сетчатки глаза размером примерно 3-5 миллиметров, прилегающий к зрительному нерву. Это наиболее чувствительная область сетчатки, которая содержит центральную ямку, углубленную область, которая обеспечивает высокую остроту зрения и содержит плотную концентрацию колбочек, фоторецепторов, которые отвечают за цветовое зрение.

Возрастная макулодистрофия (ВМД) является наиболее распространенной причиной функциональной слепоты в развитых странах у лиц старше 50 лет (Seddon, J.M., Epidemiology of age-related macular degeneration. В: Ogden, T.E., et al., eds. Ryan S.J., ed-in-chief. Retina Vol II. 3rd ed. St. Louis, Mo.: Mosby; 2001: 1039-1050). Влажная форма ВМД связана с неоваскуляризацией, начинающейся из хориоидальной сосудистой сети и распространяющейся в субретинальное пространство. Кроме того, для ВМД характерна прогрессирующая дегенерация сетчатки, пигментного эпителия сетчатки (ПЭС) и подлежащей сосудистой оболочки (сильно васкуляризированной ткани, расположенной под ПЭС, между сетчаткой и склерой).

Различные факторы, включая окислительный стресс, воспаление с возможным аутоиммунным компонентом, генетический фон (например, мутации), а также экологические или поведенческие факторы, такие как курение и рацион питания, могут способствовать патогенезу ВМД.

Клиническое течение ВМД характеризуется стадиями, соответствующими изменениям в желтом пятне. Характерным признаком ранней ВМД является появление друз, которые представляют собой скопления внеклеточного дебриса под сетчаткой и проявляются в виде желтых пятен на сетчатке при клиническом осмотре и на фотоснимках глазного дна. Друзы подразделяются по размерам на мелкие (<63 мкм), средние (63-124 мкм) и крупные (>124 мкм). Также они подразделяются на твердые или мягкие, в зависимости от внешнего вида их краев при офтальмологическом обследовании. Тогда как твердые друзы имеют четко очерченные края, мягкие друзы имеют менее четкие, подвижные края. Шкала для оценки тяжести возрастных заболеваний глаз при

исследовании глазного дна (AREDS) является одной из основных систем классификации, используемых при таком состоянии.

ВМД подразделяют на "сухую" и "влажную" (экссудативную или неоваскулярную) формы. Сухая форма ВМД обычно характеризуется прогрессирующим апоптозом клеток в слое ПЭС, покрывающем фоторецепторные клетки, а также часто подлежащих клеток в слое капилляров сосудистой оболочки. Сливающиеся участки гибели клеток ПЭС, сопровождаемые атрофией вышележащих фоторецепторов, называются географической атрофией, которая представляет собой поздние стадии развития сухой ВМД. У пациентов с этой формой ВМД наблюдается медленное и прогрессирующее ухудшение центрального зрения.

Влажная форма ВМД характеризуется кровотоком и/или повышенной проницаемостью аномальных сосудов, которые проросли из хориоидальных сосудов (хориокапилляров) под ПЭС и в субретинальное пространство желтого пятна, что может быть причиной внезапной и инвалидизирующей потери зрения. По некоторым оценкам большая часть потери зрения, которую испытывают пациенты, связана с такой хориоидальной неоваскуляризацией (ХНВ) и ее вторичными осложнениями. Подтип неоваскулярной ВМД называется ретинальной ангиоматозной пролиферацией (РАП). В данном случае ангиоматозная пролиферация происходит из сетчатки и распространяется кзади в субретинальное пространство, в конечном итоге сообщаясь, в некоторых случаях, с новыми хориоидальными сосудами. Также известно, что развивается полипоидная хориоидальная васкулопатия (ПХВ).

Существующие варианты лечения влажной ВМД в основном представляют собой ряд терапий, которые направлены на путь фактора роста эндотелия сосудов (VEGF). Примеры таких VEGF-направленных терапевтических средств включают аптамер пэгаптаниб (N Engl J Med (2004) 351: 2805-2816) и такие антитела, как ранибизумаб (N Engl J Med (2006) 355: 1432-1444), афлиберцепт (BMJ (2014) 98: i17-i21) и бевацизумаб (BMJ (2010) 340: c2459). Однако не все пациенты отвечают на лечение антителом против VEGF, и либо у них не восстанавливается зрение, либо заболевание прогрессирует до зарегистрированной слепоты. Также сообщали о постепенном снижении остроты зрения (VA), наблюдаемом при ежемесячном лечении (Singer et al.; Ophthalmology; 2012; 119(6); 1175-83).

Кроме того, имеются данные, подтверждающие связь между терапией против VEGF и прогрессированием географической атрофии (Gemenetza et al.; Eye; 2017; 31; 1-9, Enslow et al.; Ophthalmology and Eye Diseases; 2016; 8; 21-32 и Sadda et al.; Ophthalmology; 2020; 127(5); 648-659).

Также существует потребность в терапевтической стратегии для снижения лекарственной нагрузки на пациентов и решения проблем, связанных с соблюдением режима лечения и/или введением недостаточных доз.

Таким образом, в уровне техники существует значимая потребность в новых подходах к лечению заболеваний глаз, таких как ВМД.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Без ограничения какой-либо теорией, настоящее изобретение основано, по меньшей мере, частично, на понимании того, что может быть эффективным направленно воздействовать на основные механизмы, обычно связанные с "сухой" ВМД, одновременно с воздействием на механизмы, обычно связанные с "влажной" ВМД. Кроме того, изобретение частично основано на рассмотрении того, как направленное терапевтическое воздействие на одну форму ВМД может влиять на другую.

В первом аспекте настоящего изобретения предложен продукт, включающий: (i) молекулу против VEGF; и (ii) негативный регулятор комплемента или кодирующие его нуклеотидные последовательности в виде комбинированного препарата для одновременного, раздельного или последовательного применения в терапии.

В одном варианте осуществления продукт может быть одним или больше полинуклеотидами, которые одновременно кодируют (i) молекулу против VEGF; и (ii) негативный регулятор комплемента.

Таким образом, в предпочтительном варианте осуществления предложен полинуклеотид, который кодирует молекулу против VEGF и негативный регулятор комплемента.

Предпочтительно полинуклеотид представляет собой бицистронный полинуклеотид, кодирующий молекулу против VEGF и негативный регулятор комплемента.

В частности, заявителем предложены векторы, которые можно применять для доставки пациенту как молекулы против VEGF, так и негативного регулятора комплемента. В частности, заявителем были успешно сконструированы функциональные AAV векторы, которые могут быть получены с хорошими титрами и включают нуклеотидные последовательности, кодирующие как молекулу против VEGF, так и негативный регулятор комплемента.

Молекула против VEGF может быть выбрана из Ig-слитого белка, антитела, аптамера, полипептида, пептида, полинуклеотида (например, антисмыслового олигонуклеотида, мiРНК, мшРНК, гидовой цепи CRISPRi последовательности, которая направлена на последовательность гена VEGF или его мРНК) и неиммуноглобулинового каркаса. Предпочтительно молекула против VEGF выбрана из афлиберцепта, ранибизумаба, бевацизумаба, бролуцизумаба и пэгаптаниба или их фрагмента или варианта.

Негативный регулятор комплемента может быть выбран из фактора комплемента I (CFI), подобного фактору комплемента H белка 1 (FHL1), фактора комплемента H (CFH), рецептора комплемента типа 1 (CR1), мембранного кофакторного белка (MCP), фактора ускорения распада комплемента (DAF) и MAC-ингибирующего белка (MAC-IP), C1-ингибитора, ингибитора анафилатоксинов, C4b-связывающего белка (C4BP), кластерина, витронектина или их фрагмента или варианта.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид дополнительно включает

нуклеотидную последовательность, кодирующую промотор ЦМВ или промотор куриного β -актина. Предпочтительно промотор ЦМВ или CAG расположен перед нуклеотидными последовательностями, кодирующими молекулу против VEGF и негативный регулятор комплемента. Промотор куриного β -актина может быть представлен в комбинации с ранним энхансером ЦМВ (т.е. в виде CAG промотора).

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид дополнительно включает нуклеотидную последовательность, кодирующую регуляторный элемент WPRE. Предпочтительно регуляторный элемент WPRE расположен после нуклеотидных последовательностей, кодирующих молекулу против VEGF и негативный регулятор комплемента.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид дополнительно включает нуклеотидную последовательность, кодирующую поли-А сигнал. Предпочтительно поли-А сигнал расположен после нуклеотидных последовательностей, кодирующих молекулу против VEGF и негативный регулятор комплемента.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид дополнительно включает нуклеотидную последовательность, кодирующую поли-А сигнал бычьего гормона роста. Предпочтительно поли-А сигнал бычьего гормона роста расположен после нуклеотидных последовательностей, кодирующих молекулу против VEGF и негативный регулятор комплемента.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид дополнительно включает нуклеотидные последовательности, кодирующие:

(a) промотор ЦМВ или промотор CAG, где промотор ЦМВ или промотор CAG расположен перед нуклеотидными последовательностями, кодирующими молекулу против VEGF и негативный регулятор комплемента; и

(b) поли-А сигнал бычьего гормона роста, где поли-А сигнал бычьего гормона роста расположен после нуклеотидных последовательностей, кодирующих молекулу против VEGF и негативный регулятор комплемента.

В других вариантах осуществления полинуклеотид дополнительно включает нуклеотидные последовательности, кодирующие:

(a) промотор ЦМВ или промотор CAG, где промотор ЦМВ или промотор CAG расположен перед нуклеотидными последовательностями, кодирующими молекулу против VEGF и негативный регулятор комплемента;

(b) регуляторный элемент WPRE, где регуляторный элемент WPRE расположен после нуклеотидных последовательностей, кодирующих молекулу против VEGF и негативный регулятор комплемента; и

(c) поли-А сигнал бычьего гормона роста, где поли-А сигнал бычьего гормона роста расположен после нуклеотидных последовательностей, кодирующих молекулу против VEGF и негативный регулятор комплемента.

регуляторный элемент WPRE может быть регуляторным элементом WPRE3.

Нуклеотидная последовательность, кодирующая молекулу против VEGF, может

регулятор комплемента, расположена перед нуклеотидной последовательностью, кодирующей молекулу против VEGF, где негативным регулятором комплемента является CFI или его вариант или фрагмент. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая негативный регулятор комплемента, расположена перед нуклеотидной последовательностью, кодирующей молекулу против VEGF, где негативным регулятором комплемента является FHL1 или его вариант или фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая негативный регулятор комплемента, расположена перед нуклеотидной последовательностью, кодирующей молекулу против VEGF, где молекулой против VEGF является афлиберцепт или его фрагмент или вариант, и негативным регулятором комплемента является CFI или его вариант или фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая негативный регулятор комплемента, расположена перед нуклеотидной последовательностью, кодирующей молекулу против VEGF, где молекулой против VEGF является афлиберцепт или его фрагмент или вариант, и негативным регулятором комплемента является FHL1 или его вариант или фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления нуклеотидные последовательности, кодирующие молекулу против VEGF и негативный регулятор комплемента, функционально связаны линкером. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой фуриновый, GSG, 11a1D и F2A линкер. В предпочтительных вариантах осуществления линкер содержит последовательность саморасщепляющегося 2A пептида, например P2A, или последовательность, которая включает или определена последовательностью сайта расщепления фурина, GSG, 11a1D и F2A.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид дополнительно включает один или больше инвертированных концевых повторов (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV). В предпочтительных вариантах осуществления полинуклеотид дополнительно включает два ITR AAV.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид включает ITR AAV на своем 5'-конце и ITR AAV на своем 3'-конце.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид включает:

- (a) 5' ITR AAV;
- (b) промотор ЦМВ или промотор CAG;
- (c) нуклеотидную последовательность, кодирующую молекулу против VEGF;
- (d) линкер, где линкер необязательно включает последовательность сайта расщепления фурина, GSG, 11a1D и F2A;
- (e) нуклеотидную последовательность, кодирующую негативный регулятор комплемента;
- (f) поли-А сигнал, предпочтительно поли-А сигнал бычьего гормона роста; и
- (g) 3'-ITR AAV.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид включает:

- (a) 5'-ITR AAV;
- (b) промотор ЦМВ или промотор CAG;
- (c) нуклеотидную последовательность, кодирующую молекулу против VEGF;
- (d) линкер, где линкер необязательно включает последовательность сайта расщепления фурина, GSG, 11a1D и F2A;
- (e) нуклеотидную последовательность, кодирующую негативный регулятор комплемента;
- (f) регуляторный элемент WPRE, где регуляторный элемент WPRE необязательно является регуляторным элементом WPRE3;
- (g) поли-А сигнал, предпочтительно поли-А сигнал бычьего гормона роста; и
- (h) 3'-ITR AAV.

Предпочтительно полинуклеотиды, определенные в (c) и (e), в полинуклеотиде можно менять местами.

В частности, в некоторых вариантах осуществления полинуклеотид включает:

- (a) 5'-ITR AAV;
- (b) промотор ЦМВ или промотор CAG;
- (c) нуклеотидную последовательность, кодирующую негативный регулятор комплемента;
- (d) линкер, где линкер необязательно включает последовательность сайта расщепления Фурина, GSG, 11a1D и F2A;
- (e) нуклеотидную последовательность, кодирующую молекулу против VEGF;
- (f) поли-А сигнал, предпочтительно поли-А сигнал бычьего гормона роста; и
- (g) 3'-ITR AAV.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид включает:

- (a) 5'-ITR AAV;
- (b) промотор ЦМВ или промотор CAG;
- (c) нуклеотидную последовательность, кодирующую негативный регулятор комплемента;
- (d) линкер, где линкер необязательно включает последовательность сайта расщепления Фурина, GSG, 11a1D и F2A;
- (e) нуклеотидную последовательность, кодирующую молекулу против VEGF;
- (f) регуляторный элемент WPRE, где регуляторный элемент WPRE необязательно является регуляторным элементом WPRE3;
- (g) поли-А сигнал, предпочтительно поли-А сигнал бычьего гормона роста; и
- (h) 3'-ITR AAV.

Предпочтительно в вариантах осуществления, где (b) включает промотор CAG; (f) может быть регуляторным элементом WPRE3.

Полинуклеотид может включать (a)-(g) или (a)-(h) в порядке от 5' к 3'.

В некоторых вариантах осуществления ITR-повторы AAV являются ITR-повторами AAV2 или AAV8. В предпочтительных вариантах осуществления ITR-повторы

AAV являются ITR-повторами AAV2.

В некоторых вариантах осуществления нуклеотидные последовательности, кодирующие молекулу против VEGF и/или негативный регулятор комплемента, являются кодон-оптимизированными. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая молекулу против VEGF, является кодон-оптимизированной. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая негативный регулятор комплемента, является кодон-оптимизированной. В предпочтительных вариантах осуществления нуклеотидные последовательности, кодирующие афлиберцепт и CFI, FHL1 или CFH, являются кодон-оптимизированными.

В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая афлиберцепт, обладает по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с SEQ ID NO: 11.

В предпочтительных вариантах осуществления нуклеотидной последовательностью, кодирующей афлиберцепт, является SEQ ID NO: 11.

В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая CFI, обладает по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с SEQ ID NO: 35 или 36.

В предпочтительных вариантах осуществления нуклеотидной последовательностью, кодирующей CFI, является SEQ ID NO: 35 или 36.

В некоторых вариантах осуществления нуклеотидной последовательностью, кодирующей афлиберцепт, является SEQ ID NO: 11, и нуклеотидной последовательностью, кодирующей CFI, является SEQ ID NO: 35 или 36.

В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая FHL1, обладает по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с SEQ ID NO: 41.

В предпочтительных вариантах осуществления нуклеотидной последовательностью, кодирующей FHL1, является SEQ ID NO: 41.

В некоторых вариантах осуществления нуклеотидной последовательностью, кодирующей афлиберцепт, является SEQ ID NO: 11, и нуклеотидной последовательностью, кодирующей FHL1, является SEQ ID NO: 41.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид включает нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 45, или нуклеотидную последовательность, обладающую по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с ней.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид включает нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 46 или нуклеотидную последовательность, обладающую по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%,

96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с ней.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид включает нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 47, или нуклеотидную последовательность, обладающую по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с ней.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид включает нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 48, или нуклеотидную последовательность, обладающую по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с ней.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид включает нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 49, или нуклеотидную последовательность, обладающую по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с ней.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид включает нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 50, или нуклеотидную последовательность, обладающую по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с ней.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид включает нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 51, или нуклеотидную последовательность, обладающую по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с ней.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид включает нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 52, или нуклеотидную последовательность, обладающую по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с ней.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид включает нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 53, или нуклеотидную последовательность, обладающую по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с ней.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид включает нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 54, или нуклеотидную последовательность, обладающую по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с ней.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид меньше или равен 5,2, 5,1, 5,0, 4,9, 4,8 или 4,7 тн. В предпочтительных вариантах осуществления полинуклеотид меньше или равен 4,7 тн.

В другом аспекте изобретения предложен вектор, включающий полинуклеотид согласно изобретению. Таким образом, согласно одному аспекту изобретения предложен вектор, включающий: (i) полинуклеотид, кодирующий молекулу против VEGF, и (ii) полинуклеотид, кодирующий негативный регулятор комплемента. Предпочтительно

молекула против VEGF и негативный регулятор комплемента представлены на одном полинуклеотиде, который предпочтительно является бицистронным полинуклеотидом.

Предпочтительно бицистронный полинуклеотид при использовании в настоящем документе может относиться к полинуклеотиду, включающему по меньшей мере две кодирующих белок области, каждая из которых функционально связана с одной и той же промоторной областью. Предпочтительно бицистронный полипептид может включать две кодирующих белок области, каждая из которых функционально связана с одной и той же промоторной областью.

Предпочтительно в настоящем изобретении также предложены больше одного (например, два) вектора, которые совместно включают: (i) полинуклеотид, кодирующий молекулу против VEGF, и (ii) полинуклеотид, кодирующий негативный регулятор комплемента.

В некоторых вариантах осуществления вектор является вектором на основе аденоассоциированного вируса (AAV), ретровируса, лентивируса или аденовируса.

В предпочтительных вариантах осуществления вектор является вектором AAV.

В некоторых вариантах осуществления вектор находится в форме вирусной векторной частицы.

В некоторых вариантах осуществления векторная частица AAV включает геном AAV2 или AAV8, предпочтительно геном AAV2.

В некоторых вариантах осуществления векторная частица AAV включает капсидные белки AAV2 или AAV8.

В некоторых вариантах осуществления векторная частица AAV включает геном AAV2 и капсидные белки AAV2 (AAV2/2). В предпочтительных вариантах осуществления векторная частица AAV включает геном AAV2 и капсидные белки AAV8 (AAV2/8).

В другом аспекте изобретения предложена клетка, включающая полинуклеотид согласно изобретению.

В другом аспекте изобретения предложена клетка, трансдуцированная вектором согласно изобретению.

В другом аспекте изобретения предложена фармацевтическая композиция, включающая полинуклеотид, вектор или клетку согласно изобретению в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем, разбавителем или вспомогательным веществом.

В предпочтительных вариантах осуществления фармацевтическая композиция предназначена для внутриглазного введения.

В другом аспекте изобретения предложен продукт, полинуклеотид, вектор, клетка или фармацевтическая композиция согласно изобретению для применения в терапии.

В другом аспекте изобретения предложен продукт, полинуклеотид, вектор, клетка или фармацевтическая композиция согласно изобретению для применения в лечении или профилактике глазного нарушения.

В другом аспекте изобретения предложен продукт, полинуклеотид, вектор, клетка или фармацевтическая композиция согласно изобретению для применения в лечении или профилактике комплемент-опосредованного заболевания глаза.

В другом аспекте изобретения предложен способ лечения или профилактики комплемент-опосредованного заболевания глаза, включающего введение продукта, полинуклеотида, вектора, клетки или фармацевтической композиции согласно изобретению нуждающемуся в этом субъекту.

В другом аспекте изобретения предложен способ предоставления молекулы против VEGF и негативного регулятора комплемента субъекту, включающий доставку продукта, полинуклеотида, вектора или клетки согласно изобретению в глаз субъекта.

В конкретных вариантах осуществления продукт, полинуклеотид, вектор, клетка или фармацевтическая композиция согласно изобретению применяются при лечении комплемент-опосредованных нарушений, в особенности хронических воспалительных заболеваний, и, еще более конкретно, таких нарушений, которые ассоциированы с повышенной активностью цикла комплемента с обратной связью с C3b.

В некоторых вариантах осуществления нарушение связано с повышенной активностью цикла комплемента с обратной связью с C3b и/или пониженной активностью цикла с расщеплением C3b (см. Фигуру 5).

В некоторых вариантах осуществления нарушением является возрастная макулодистрофия (ВМД) или диабетическая ретинопатия. В других вариантах осуществления нарушением является глаукома, болезнь Штаргардта, центральная серозная хориоретинопатия, пигментный ретинит, полипоидная хориоидальная васкулопатия, диабетический макулярный отек, окклюзия ветки вены сетчатки или увеит.

В предпочтительных вариантах осуществления нарушением является ВМД.

В некоторых вариантах осуществления нарушением является влажная ВМД и/или сухая ВМД. В некоторых вариантах осуществления продукт, полинуклеотид, вектор, клетку или фармацевтическую композицию применяют для лечения и/или предупреждения влажной ВМД и сухой ВМД одновременно.

В некоторых вариантах осуществления ВМД представляет собой влажную ВМД, и применение согласно изобретению дополнительно предупреждает и/или лечит начальную стадию сухой ВМД у указанного субъекта. В некоторых вариантах осуществления ВМД представляет собой сухую ВМД, и применение согласно изобретению дополнительно предупреждает и/или лечит начальную стадию влажной ВМД у указанного субъекта.

В некоторых вариантах осуществления у субъекта была диагностирована ВМД или присутствует риск приобретения ВМД.

В некоторых вариантах осуществления применение предназначено для лечения или предупреждения нарушения у субъекта:

(а) имеющего активность или концентрацию фактора I комплемента ниже нормы в глазу и/или сыворотке, предпочтительно имеющего концентрацию или активность, эквивалентную, 0-30, 0-20 или 0-10 мкг/мл, в сыворотке; и/или

(b) гетерозиготного или гомозиготного по SNP, ассоциированному с возрастной макулодистрофией (ВМД), предпочтительно с редким вариантом фактора комплемента I и/или фактора комплемента H.

В некоторых вариантах осуществления применение предназначено для лечения или предупреждения нарушения у субъекта:

(a) имеющего нормальный уровень активности или концентрации фактора комплемента I в глазу и/или сыворотке, предпочтительно по меньшей мере 30 мкг/мл, такой как 30-40 мкг/мл, в сыворотке; и/или

(b) не имеющего аллель редкого варианта фактора комплемента I.

В другом аспекте изобретения предложен продукт, полинуклеотид, вектор, клетка или фармацевтическая композиция согласно изобретению для применения при лечении или профилактике диабетической ретинопатии.

В некоторых вариантах осуществления формирование географической атрофии предотвращено или уменьшено, и/или количество географической атрофии уменьшено.

В некоторых вариантах осуществления прогрессирование географической атрофии замедлено.

В некоторых вариантах осуществления присутствует по меньшей мере 10% снижение увеличения области географической атрофии в течение 12 месяцев после введения в подвергнутый лечению глаз субъекта по сравнению с не подвергавшимся лечению глазом за тот же период. В других вариантах осуществления присутствует по меньшей мере 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% снижение увеличения области географической атрофии в течение 12 месяцев после введения в подвергнутый лечению глаз субъекта по сравнению с не подвергавшимся лечению глазом за тот же период.

В некоторых вариантах осуществления введение продукта, полинуклеотида, вектора, клетки или фармацевтической композиции повышает уровень C3b-инактивирующей и iC3b-расщепляющей активности у субъекта, или в глазу, например, в пигментном эпителии сетчатки (ПЭС), внутриглазной жидкости и/или стекловидном теле субъекта, необязательно до уровня, который превышает нормальный уровень у субъекта, или в его глазу или ПЭС.

В другом аспекте изобретения предложен продукт, полинуклеотид, вектор, клетка или фармацевтическая композиция согласно изобретению для применения в улучшении или восстановлении видения или остроты зрения, например, у субъекта, страдающего глазным нарушением, таким как глазное нарушение, раскрытое в настоящем документе. В другом аспекте изобретения предложен продукт, полинуклеотид, вектор или клетка согласно изобретению для применения в уменьшении потери зрения или остроты зрения, например, потери зрения или остроты зрения, связанной с глазным нарушением, таким как глазное нарушение, раскрытое в настоящем документе.

В другом аспекте изобретения предложен продукт, полинуклеотид, вектор, клетка или фармацевтическая композиция согласно изобретению для применения в улучшении

или восстановлении скорости чтения у субъекта, например, у субъекта, страдающего глазным нарушением, таким как глазное нарушение, раскрытое в настоящем документе. В другом аспекте изобретения предложен продукт, полинуклеотид, вектор или клетка согласно изобретению для применения в уменьшении снижения скорости чтения у субъекта, например, снижения скорости чтения, связанной с глазным нарушением, таким как глазное нарушение, раскрытое в настоящем документе.

В другом аспекте изобретения предложен продукт, полинуклеотид, вектор, клетка или фармацевтическая композиция согласно изобретению для применения в снижении или предотвращении потери фоторецепторов и/или пигментного эпителия сетчатки (ПЭС), например, потери фоторецепторов и/или ПЭС, связанной с глазным нарушением, таким как глазное нарушение, раскрытое в настоящем документе.

В другом аспекте изобретения предложен продукт, полинуклеотид, вектор, клетка или фармацевтическая композиция согласно изобретению для применения в снижении или предотвращении неоваскуляризации, повышения проницаемости сосудов или отека сетчатки при глазном нарушении, таком как глазное нарушение, раскрытое в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления продукт, полинуклеотид, вектор, клетку или фармацевтическую композицию вводят внутриглазным путем.

В некоторых вариантах осуществления продукт, полинуклеотид, вектор, клетку или фармацевтическую композицию вводят в глаз субъекта путем субретинальной, прямой ретинальной, супрахориоидальной или интравитреальной инъекции.

В некоторых вариантах осуществления продукт, полинуклеотид, вектор, клетку или фармацевтическую композицию вводят в глаз субъекта путем субретинальной инъекции.

В некоторых вариантах осуществления продукт, полинуклеотид, вектор, клетку или фармацевтическую композицию согласно изобретению не вводят системно. В других вариантах осуществления продукт, полинуклеотид, вектор, клетку или фармацевтическую композицию согласно изобретению не вводят внутривенно.

ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Фигура 1 - Схема, на которой показана конструкция иллюстративных моноцистронных векторов афлиберцепта и размер генома AAV (ITR-ITR)

Фигура 2 - Сравнение экспрессии афлиберцепта с разными кодон-оптимизированными векторами AAV2. Данные показывают два независимых эксперимента.

Фигура 3 - Репрезентативные изображения Вестерн-блотов, полученных в невосстанавливающих (А) и (В) восстанавливающих условиях, которые иллюстрируют экспрессию белка афлиберцепта в супернатанте культуры через 72 часа после трансдукции. (С) Денситометрический анализ экспрессии афлиберцепта в невосстанавливающих и восстанавливающих условиях из двух независимых экспериментов.

Фигура 4 - Схематические диаграммы, на которых представлена конструкция иллюстративных бицистронных векторов, экспрессирующих негативный регулятор комплемента и афлиберцепт.

Фигура 5 - Циклы с обратной связью (амплификация) и расщеплением (даунрегуляция) C3b альтернативного пути комплемента у позвоночных ("I"=Фактор комплемента I; "H"=Фактор комплемента H; "B"=Фактор комплемента B; и "D"=Фактор комплемента D).

Фигура 6 - Введение моноцистронных векторов, экспрессирующих CFI (GT005) или FHL1 (RC001), в модели ХНВ на мышах.

Фигура 7 - Сравнение экспрессии с бицистронного вектора в клетках HEK293. Репрезентативные уровни экспрессии: (A) бицистронной экспрессии AAV8 афлиберцепта и CFI; (B) бицистронная экспрессия AAV2 афлиберцепта (полоса слева) и CFI (полоса справа) при MOI 5e3; (C) бицистронная экспрессия AAV8 афлиберцепта и FHL-1 и (D) бицистронная экспрессия AAV2 афлиберцепта (полоса слева) и FHL-1 (полоса справа) при MOI 5e3; (E) бицистронная экспрессия AAV8 афлиберцепта и CFI; (F) Бицистронная экспрессия AAV8 афлиберцепта и FHL-1.

Фигура 8 - Вестерн-блоттинг, показывающий экспрессию белка с бицистронных векторов в невозстанавливающих условиях.

Фигура 9 - Аффинность связывания афлиберцепта. Аффинность афлиберцепта, экспрессируемого с моноцистронных и бицистронных векторов, к VEGFA, определенная с помощью анализа связывания, который измеряет несвязанный VEGFA после инкубирования фиксированной концентрации человеческого VEGFA с различными концентрациями афлиберцепта, полученного с векторов. Значение IC50 Эйлеа®, полученное из кривой Kd, равно 2,3 нМ.

Фигура 10 - Ингибирующие свойства афлиберцепта. Ингибирование VEGFA-индуцированной пролиферации клеток HUVEC с использованием различных концентраций афлиберцепта, полученного с вектора, в присутствии фиксированной концентрации VEGFA.

Фигура 11 - Анализы с расщеплением C3b для CFI и FHL1 продемонстрировали, что CFI и FHL1, экспрессируемые с бицистронных векторов, являются функциональными и могут способствовать расщеплению C3b до iC3b.

Фигура 12 - Экспрессия мРНК афлиберцепта - моноцистронный афлиберцепт (мышь). Векторы AAV8 (моноцистронные), экспрессирующие средство против VEGF (афлиберцепт), вводили субретинально в правый глаз девятинедельным самцам мышей. Полученную с трансгена мРНК определяли количественно с помощью обратной транскрипции и кПЦР-РВ.

Фигура 13 - Экспрессия белка афлиберцепта - моноцистронный афлиберцепт (мышь). Векторы AAV8 (моноцистронные), экспрессирующие средство против VEGF (афлиберцепт), вводили субретинально в правый глаз девятинедельным самцам мышей. Несвязанный афлиберцепт в глазных жидкостях измеряли с помощью количественного

ИФА сэндвич-типа.

Фигура 14 - Экспрессия мРНК афлиберцепта - бицистронные кандидаты (мышь). Бицистронные векторы AAV, коэкспрессирующие средство против VEGF (афлиберцепт) и регуляторы комплемента (hCFI или FHL-1), вводили субретинально в правый глаз (OD) 10-недельных самцов мышей. Полученную с трансгена мРНК определяли количественно с помощью обратной транскрипции и кПЦР-РВ.

Фигура 15 - Экспрессия белков афлиберцепта, CFI и FHL-1 (бицистронные векторы). Бицистронные векторы AAV, коэкспрессирующие средство против VEGF (афлиберцепт) и регуляторы комплемента (hCFI или FHL-1), вводили субретинально в правый глаз (OD) 10-недельных самцов мышей. Несвязанный афлиберцепт в глазных жидкостях измеряли с помощью количественного ИФА сэндвич-типа. CFI и FHL-1 человека в глазных жидкостях определяли количественно с применением технологии детектирования электрохемилюминесценции MSD.

Фигура 16 - Эффективность *in vivo* в мышинной модели хориоидальной неоваскуляризации, индуцированной лазером. Пять групп мышей получали односторонние (правый глаз) субретинальные инъекции различных векторов на основе AAV. Через четыре недели после введения векторов индуцировали ХНВ посредством лазерной фотокоагуляции. Мышей визуализировали на четвертый и седьмой день после лазерной обработки, а затем умерщвляли. Проводили количественный анализ (А) площади утечки ХНВ и (В) размера поражения ХНВ.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Термины "включающий", "включает" и "состоит из" при использовании в настоящем документе являются синонимами "содержащий" или "содержит" и являются включительными или открытыми и не исключают дополнительных, неуказанных членов, элементов или этапов. Термины "включающий", "включает" и "состоит из" также включают термин "состоящий из".

VEGF

Фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) представляет собой мощный ангиогенный белок, продуцируемый клетками, который стимулирует формирование кровеносных сосудов. VEGF - подсемейство факторов роста, семейство тромбоцитарных факторов роста, включающее факторы роста с цистиновым узлом. Они участвуют в васкулогенезе (первичном формировании эмбриональной сердечно-сосудистой системы *de novo*) и ангиогенезе (росте кровеносных сосудов из уже существующей сосудистой сети).

У млекопитающих семейство VEGF включает пять членов: VEGF-A, плацентарный фактор роста (PGF), VEGF-B, VEGF-C и VEGF-D.

Предпочтительно VEGF, указанный в настоящем документе, может представлять собой VEGF-A.

Существует множество изоформ VEGF-A, которые образуются в результате альтернативного сплайсинга мРНК с одного 8-экзонного гена VEGFA. Они подразделяются на две группы, которые обозначают в соответствии с сайтом сплайсинга

их концевой экзона (экзона 8): проксимальный сайт сплайсинга (обозначаемый VEGF_{xxx}) или дистальный сайт сплайсинга (VEGF_{xxx}b). Кроме того, альтернативный сплайсинг экзонов 6 и 7 изменяет их гепаринсвязывающую аффинность и количество аминокислот (у человека: VEGF121, VEGF121b, VEGF145, VEGF165, VEGF165b, VEGF189, VEGF206; ортологи этих белков у грызунов содержат на одну аминокислоту меньше). Эти домены имеют важные функциональные следствия для вариантов сплайсинга VEGF, поскольку концевой (экзон 8) сайт сплайсинга определяет, являются ли белки проангиогенными (проксимальный сайт сплайсинга, экспрессируемый во время ангиогенеза, VEGF_{xxx}) или антиангиогенными (дистальный сайт сплайсинга, экспрессируемый в нормальных тканях, VEGF_{xxx}b). Кроме того, включение или исключение экзонов 6 и 7 опосредует взаимодействие с гепаринсульфат протеогликанами (HSPG) и нейрофилиновыми корцепторами на клеточной поверхности, повышая их способность связывать и активировать рецепторы VEGF (VEGFR).

VEGF взаимодействует с семейством 3 рецепторных тирозинкиназ: VEGFR1 (VEGF рецептор 1), VEGFR2 и VEGFR3. VEGFA и VEGFB связываются с VEGFR1, VEGFA связываются с VEGFR2, и VEGFC и VEGFD связываются и с VEGFR2, и с VEGFR3. Плацентарный фактор роста (PGF) в первую очередь взаимодействует с VEGFR1. Рецепторы VEGFR обнаружены в самых разных типах клеток. VEGFR1, также называемый Flt-1 (fms-подобная тирозинкиназа 1), обнаружен на эндотелиальных клетках сосудов, гемопоэтических стволовых клетках, моноцитах и макрофагах. VEGFR2, также называемый KDR (домен вставки киназы) или Flk-1 (киназа фетальной печени 1), экспрессируется на сосудистых и лимфатических эндотелиальных клетках; VEGFR3 (также называемый Flt-4) ограничен лимфатическими эндотелиальными клетками. При связывании лиганда VEGFR-рецепторы передают внутриклеточные сигналы через различные медиаторы. В случае VEGFR2, который лучше всего охарактеризован, к ним относятся фосфотидилинозитол-3 киназа (PI3K)/Akt, митоген-активируемые киназы, нерецепторная тирозинкиназа Src, а также PLC γ (фосфолипаза C гамма)/PKC (протеинкиназа C), которые способствуют ангиогенезу, лимфангиогенезу, повышению проницаемости сосудов и сосудистому гомеостазу.

VEGF-A играет важную роль в этиологии диабетической ретинопатии (ДР). Нарушения микроциркуляции в сетчатке у людей с диабетом могут вызывать ишемию сетчатки, что приводит к высвобождению VEGF-A и смещению баланса проангиогенных изоформ VEGF в сравнении с обычно экспрессируемыми антиангиогенными изоформами VEGF. Проангиогенный VEGF может затем вызвать образование новых кровеносных сосудов в сетчатке и других частях глаза, предвещая изменения, которые могут повлиять на зрение.

VEGF-A также важен в этиологии влажной формы возрастной макулодистрофии (ВМД), которая является основной причиной слепоты у пожилых людей в промышленно развитых странах. Сосудистая патология при ВМД имеет некоторое сходство с диабетической ретинопатией, хотя причина заболевания и типичный источник

неоваскуляризации при этих двух заболеваниях различаются.

При использовании в настоящем документе молекула против VEGF может относиться к любой единице, которая способна снижать экспрессию и/или активность VEGF.

Будет очевидным, что молекула против VEGF сможет вызывать снижение экспрессии и/или активности одной или больше проангиогенных изоформ VEGF, в частности VEGF-A.

Предпочтительно VEGF может представлять собой VEGFA, VEGFB и/или PGF.

Предпочтительно VEGF может представлять собой VEGFA, VEGFB и PGF.

Молекула против VEGF может быть выбрана из одного или более следующего: антитело, Ig-слитый белок, полипептид, пептид, полинуклеотид (например, антисмысловый олигонуклеотид, миРНК, мшРНК), малая молекула, неиммуноглобулиновый каркас, аптамер или их комбинации.

Термин "антитело" при использовании в настоящем документе охватывает как полноразмерные антитела, так и фрагменты антител. Подходящие антитела включают, без ограничения, моноклональные и поликлональные антитела, рекомбинантные антитела, в том числе химерные антитела, антитела с перевитыми CDR-областями и гуманизированные антитела, одноцепочечные антитела, фрагменты антител и искусственно отобранные антитела, полученные с применением фагового дисплея или альтернативных технологий.

Подходящие фрагменты антител, способные связываться с выбранной мишенью, включают Fv, ScFv, F(ab') и F(ab')₂. Кроме того, в изобретении также можно применять альтернативы классическим антителам, например, "авитела", "авимеры", "антикалины", "нанотела" и "дарпины".

Ссылка на "scFv" или "одноцепочечный переменный фрагмент" при использовании в настоящем документе включает молекулы, в которых переменная область тяжелой (VH) и переменная область легкой цепи (VL) антитела соединены посредством гибкого олигопептида. Таким образом, scFv представляет собой слитую конструкцию из по меньшей мере одной переменной области тяжелой и по меньшей мере одной переменной области легкой цепи.

Будет очевидным, что в вариантах осуществления, в которых молекула против VEGF и негативный регулятор комплемента представлены в виде выделенного полинуклеотида, молекула против VEGF будет единицей, которую может кодировать полинуклеотид. Например, молекула против VEGF может быть Ig-слитым белком, антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, полипептидом, пептидом, полинуклеотидом (например, антисмысловым олигонуклеотидом, миРНК, мшРНК, гидовой цепью CRISPRi последовательности, которая направлена на последовательность гена VEGF или его мРНК), неиммуноглобулиновым каркасом или аптамером.

Молекула против VEGF может действовать путем связывания с одним или больше VEGF и/или одним или больше рецепторами VEGF.

Молекула против VEGF может быть способна вызывать снижение пролиферативной и/или проангиогенной активности VEGF.

Например, молекула против VEGF может быть способна вызывать снижение пролиферации VEGF-зависимой клеточной линии. Подходящие клеточные линии включают, без ограничения, эндотелиальные клетки, такие как клетки эндотелия пупочной вены человека (HUVEC) и линию клеток Ba/F3-VEGFR2, описанную в публикации Wentink et al. (Br J Cancer; 2016; 115(8); 940-948).

Молекула против VEGF может снижать пролиферацию VEGF-зависимой клеточной линии по меньшей мере в 1 раз (предпочтительно по меньшей мере в 1,5 раза, по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 2,5 раза, по меньшей мере в 3 раза, по меньшей мере в 4 раза или по меньшей мере в 5 раз по сравнению с пролиферацией в отсутствие молекулы против VEGF. Молекула против VEGF может снижать пролиферацию VEGF-зависимой клеточной линии по меньшей мере на 10% (предпочтительно по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 100%, по меньшей мере на 100%%, по меньшей мере на 150% или по меньшей мере на 200%) по отношению к пролиферации в отсутствие молекулы против VEGF.

Молекула против VEGF может быть выбрана из афлиберцепта, ранибизумаба, бевацизумаба и пэгаптаниба или их фрагмента или варианта.

Молекула против VEGF может быть выбрана из афлиберцепта, ранибизумаба и пэгаптаниба или их фрагмента или варианта.

Молекула против VEGF может быть выбрана из афлиберцепта и ранибизумаба или их фрагмента или варианта.

Молекулой против VEGF может быть афлиберцепт или его фрагмент или вариант.

Молекулой против VEGF может быть ранибизумаб или его фрагмент или вариант.

Молекулой против VEGF может быть бевацизумаб или его фрагмент или вариант.

Молекулой против VEGF может быть пэгаптаниб или его фрагмент или вариант.

Молекулой против VEGF может быть афлиберцепт. Афлиберцепт связывается с циркулирующими VEGF и действует как "ловушка VEGF". Таким образом, он ингибирует активность подтипов VEGF, VEGF-A и VEGF-B, а также PGF. Афлиберцепт представляет собой рекомбинантный белок, состоящий из связывающих доменов VEGFR1 и VEGFR2, слитых с Fc-областью иммуноглобулина гамма 1 человека (IgG1). Структурно афлиберцепт представляет собой димерный гликопротеин с молекулярной массой белка 96,9 кДа.

Иллюстративная аминокислотная последовательность афлиберцепта показана как SEQ ID NO:1.

SEQ ID NO: 1

SDTGRPFVEMYSEIPEIHMTEGRELVIPCRVTSFNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIW
DSRKGFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNLYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEK
LVLNCTARTELVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRS

DQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM
 ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH
 QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV
 KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFNCSV
 MHEALHNHYTQKSLSLSPG

Аминокислотная последовательность афлиберцепта может включать последовательность, показанную как SEQ ID NO:1. Вариант может обладать по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с SEQ ID NO:1. Предпочтительно фрагмент или вариант по существу сохраняют функциональную активность белка, показанного как SEQ ID NO:1.

Аминокислотную последовательность афлиберцепта может кодировать полинуклеотидная последовательность, показанная как SEQ ID NO: 2-11.

SEQ ID NO: 2

AGTGATACAGGTAGACCTTTCGTAGAGATGTACAGTGAAATCCCCGAAATTA
 TACACATGACTGAAGGAAGGGAGCTCGTCATTCCTGCCGGGTACGTCACCTAACA
 TCACTGTTACTTTAAAAAAGTTTCCACTTGACACTTTGATCCCTGATGGAAAACGCA
 TAATCTGGGACAGTAGAAAGGGCTTCATCATATCAAATGCAACGTACAAAGAAATA
 GGGCTTCTGACCTGTGAAGCAACAGTCAATGGGCATTTGTATAAGACAACTATCTC
 ACACATCGACAAACCAATACAATCATAGATGTCGTTCTGAGTCCGTCTCATGGAATT
 GAACTATCTGTTGGAGAAAAGCTTGTCTTAAATTGTACAGCAAGAACTGAACTAAAT
 GTGGGGATTGACTTCAACTGGGAATACCCTTCTTCGAAGCATCAGCATAAGAACTT
 GTAAACCGAGACCTAAAAACCCAGTCTGGGAGTGAGATGAAGAAATTTTTGAGCAC
 CTTAACTATAGATGGTGTAACCCGGAGTGACCAAGGATTGTACACCTGTGCAGCATC
 CAGTGGGCTGATGACCAAGAAGAACAGCACATTTGTCAGGGTCCATGAAAAAGACA
 AAACCTCACACATGCCACCGTGCCACAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCT
 TCCTCTTCCCCCAAACCCAAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCA
 CATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTAC
 GTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACA
 ACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATG
 GCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAA
 ACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCC
 ATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCT
 TCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAAC
 TACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAG
 CTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGAT
 GCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTTG
 A

В некоторых вариантах осуществления нуклеотидные последовательности, кодирующие афлиберцепт (или любую другую молекулу против VEGF), применяемые в изобретении, являются кодон-оптимизированными. Различные клетки отличаются по

своему использованию конкретных кодонов. Такое смещение по кодомам соответствует смещению по относительной представленности конкретных тРНК в клетке определенного типа. При таком изменении кодонов в последовательности, чтобы они были подобраны в соответствии с относительной представленностью соответствующих тРНК, можно повысить экспрессию. К тому же можно снизить экспрессию путем специального подбора кодонов, которым соответствуют тРНК, которые, как известно, редкие в клетке конкретного типа. Таким образом, становится доступной дополнительная степень контроля на уровне трансляции.

Иллюстративные кодон-оптимизированные нуклеотидные последовательности, кодирующие афлиберцепт, показаны как SEQ ID NO: 3-11.

SEQ ID NO: 3

TCTGATACCGGCAGACCCTTCGTGGAAATGTACAGCGAGATCCCCGAGATCA
 TCCACATGACCGAGGGCAGAGAGCTGGTCATCCCCTGCAGAGTGACAAGCCCCAAC
 ATCACCGTGACTCTGAAGAAGTTCCTCTGGACACACTGATCCCCGACGGCAAGAG
 AATCATCTGGGACAGCCGGAAGGGCTTCATCATCAGCAACGCCACCTACAAAGAGA
 TCGGCCTGCTGACCTGTGAAGCCACCGTGAATGGCCACCTGTACAAGACCAACTACC
 TGACACACAGACAGACCAACACCATCATCGACGTGGTGCTGAGCCCTAGCCACGGC
 ATTGAACTGTCTGTGGGCGAGAAGCTGGTGCTGAACTGTACCGCCAGAACCGAGCT
 GAACGTGGGCATCGACTTCAACTGGGAGTACCCCAGCAGCAAGCACCAGCACAAGA
 AACTGGTCAACCGGGACCTGAAAACCCAGAGCGGCAGCGAGATGAAGAAATTCCTG
 AGCACCCCTGACCATCGACGGCGTGACCAGATCTGACCAGGGCCTGTACACATGTGC
 CGCCAGCTCTGGCCTGATGACCAAGAAAAACAGCACCTTCGTGCGGGTGCACGAGA
 AGGACAAGACCCACACCTGTCCTCCATGTCCTGCTCCAGAACTGCTCGGCGGACCTT
 CCGTGTTCCCTGTTTCCTCCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCCTG
 AAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCCACGAGGATCCCGAAGTGAAGTTCAAT
 TGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAAC
 AGTACAATAGCACCTACAGAGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGATTGG
 CTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCTCCTAT
 CGAGAAAACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACCCCAGGTTTACACAC
 TGCCTCCAAGCAGGGACGAGCTGACAAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTC
 AAGGGCTTCTACCCTTCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAATGGCCAGCCTGA
 GAACAACCTACAAGACAACCCCTCCTGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTTCCTGTA
 CAGCAAGCTGACAGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTTCAGCTGCA
 GCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGTCTC
 CTGGCTAA

SEQ ID NO: 4

TCTGATACCGGCAGACCCTTCGTGGAAATGTACAGCGAGATCCCCGAGATCA
 TTCACATGACCGAGGGCAGAGAGCTGGTCATCCCCTGCCGAGTGACAAGCCCCAAC
 ATCACCGTGACTCTGAAGAAATTCCTCTGGACACACTGATCCCCGACGGCAAGAG
 AATCATTTGGGACAGCCGGAAGGGCTTCATCATTAGCAACGCCACCTACAAAGAGA

TCGGCCTGCTCACCTGTGAAGCCACCGTGAATGGCCACCTGTACAAGACCAACTACC
 TGACACACAGACAGACCAACACCATCATTGACGTGGTCCTGAGCCCTAGCCACGGC
 ATTGAACTGTCTGTGGGCGAGAAGCTGGTGTGAACTGTACCGCCAGAACCGAGCT
 GAACGTGGGCATCGACTTCAACTGGGAGTACCCCAGCTCCAAGCACCAGCACAAGA
 AACTGGTCAACCGGGACCTGAAAACCCAGAGCGGCAGCGAGATGAAGAAATTCTGTG
 AGCACCCCTGACCATCGACGGCGTGACCAGATCTGACCAGGGCCTGTACACATGTGC
 CGCTAGCTCTGGCCTGATGACCAAGAAAAACAGCACCTTCGTGCGGGTGCACGAGA
 AGGACAAGACCCACACCTGTCTCCATGTCTGCTCCCGAACTGCTCGGCGGACCTT
 CCGTGTTCTGTTCCTCCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCCTG
 AAGTGACCTGCGTGGTCGTGGATGTGTCCCACGAGGATCCCGAAGTGAAGTTCAATT
 GGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACA
 GTACAATAGCACCTACAGAGTGGTCTCCGTGCTGACCGTGTGCACCAGGATTGGCT
 GAACGGCAAAGAGTACAAGTGAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCTCCTATCG
 AGAAAACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACCCAGGTTTACACACTG
 CCTCCAAGCAGGGACGAGCTGACAAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTCAA
 GGGCTTCTACCCTTCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAATGGCCAGCCTGAGA
 ACAATTACAAGACAACCCCTCCCGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTTTCTGTACT
 CCAAGCTGACAGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAAGGCAACGTGTTTACAGCTGCAGC
 GTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGTCTCT
 GGCTAA

SEQ ID NO: 5

AGCGACACCGGCAGACCCTTCGTGGAGATGTACTCCGAGATCCCTGAGATCA
 TCCACATGACCGAGGGCAGGGAGCTGGTCATCCCATGCCGCGTGACATCCCCAAC
 ATCACCGTGACACTGAAGAAGTTCCCTCTGGACACCCTGATCCCAGATGGCAAGCG
 GATCATCTGGGACTCTAGAAAGGGCTTTATCATCAGCAATGCCACATATAAGGAGA
 TCGGCCTGCTGACCTGCGAGGCCACAGTGAACGGCCACCTGTACAAGACCAATTAT
 CTGACACACAGACAGACCAACACAATCATCGATGTGGTGTGTCCCCATCTCACGGC
 ATCGAGCTGAGCGTGGGCGAGAAGCTGGTGTGAAATTGTACCGCCAGGACAGAGCT
 GAACGTGGGCATCGACTTCAATTGGGAGTACCCCAGCTCCAAGCACCAGCACAAGA
 AGCTGGTGAACAGGGATCTGAAGACCCAGAGCGGCTCCGAGATGAAGAAGTTTCTG
 TCTACCCTGACAATCGACGGAGTGACCCGCGAGCGATCAGGGACTGTATACATGCGC
 CGCCTCTAGCGGCCTGATGACCAAGAAGAACAGCACCTTCGTGCGGGTGCACGAGA
 AGGACAAGACCCACACATGCCACCTTGTCCAGCACCCAGAGCTGCTGGGAGGACCA
 AGCGTGTTCTGTTCACCCAAAGCCCAAGGATACCCTGATGATCTCTCGCACCCCC
 GAGGTGACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAGGACCCCGAGGTGAAGTTTAA
 CTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAATGCCAAGACCAAGCCTCGGGAGGAGC
 AGTACAACAGCACCTATAGAGTGGTGTCCGTGCTGACAGTGTGCACCAGGATTGG
 CTGAACGGCAAGGAGTATAAGTGCAAGGTGTCCAATAAGGCCCTGCCTGCCCAAT
 CGAGAAGACCATCTTAAGGCAAAGGGACAGCCAGGGAGCCTCAGGTGTACACAC
 TGCCTCCATCCCGCGACGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCTCTGACATGTCTGGTGA

AGGGCTTCTATCCTAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGTCCAATGGCCAGCCAGAG
 AACAAATTACAAGACCACACCCCCTGTGCTGGACTCCGATGGCTCTTTCTTTCTGTATT
 CCAAGCTGACCGTGGATAAGTCTCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTTTCTTGTAGCG
 TGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACACAGAAGTCCCTGTCTCTGAGCCCCG
 GCTGA

SEQ ID NO: 6

AGCGACACCGGCAGACCCTTCGTGGAGATGTACTCCGAGATCCCTGAGATCA
 TTCACATGACCGAGGGCAGGGAGCTGGTCATCCCATGCCGCGTGACATCCCCAAC
 ATCACCGTGACACTGAAGAAATTCCTCTGGACACCCTGATCCCAGATGGCAAGCG
 GATCATTGTTGGACTCTAGAAAGGGCTTTATCATTAGCAATGCCACATATAAGGAGAT
 CGGCCTGCTCACCTGCGAGGCCACAGTGAACGGCCACCTGTACAAGACCAATTATCT
 GACACACAGACAGACCAACACAATCATTGATGTGGTCCTGTCCCCATCTCACGGCAT
 CGAGCTGAGCGTGGGCGAGAAGCTGGTGCTGAATTGTACCGCCAGGACAGAGCTGA
 ACGTGGGCATCGACTTCAATTGGGAGTACCCAGCTCCAAGCACCAGCACAAGAAA
 CTGGTGAACAGGGATCTGAAGACCCAGAGCGGCTCCGAGATGAAGAAATTTCTGTC
 TACCCTGACAATCGACGGAGTGACCCGCAGCGATCAGGGACTGTATACATGCGCCG
 CTTCTAGCGGCCTGATGACCAAGAAAAACAGCACCTTCGTGCGGGTGCACGAGAAG
 GACAAGACCCACACATGCCACCTTGTCCAGCACCAGAGCTGCTCGGAGGCCAAG
 CGTGTTCCTGTTTCCACCCAAGCCAAGGATACCCTGATGATCTCTCGCACCCCCGA
 GGTGACATGCGTGGTCGTGGACGTGAGCCACGAGGACCCCGAGGTGAAGTTTAACT
 GGTATGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAATGCCAAGACCAAGCCTCGGGAGGAACA
 GTACAACAGCACCTATAGAGTGGTCTCCGTGCTGACAGTGTGTCACCAGGATTGGCT
 GAACGGCAAGGAGTATAAGTGCAAGGTGTCCAATAAGGCCCTGCCTGCCCAATCG
 AGAAGACCATCTCTAAGGCAAAGGGACAGCCCAGGGAGCCTCAGGTGTACACACTG
 CCTCCATCCCGCGACGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCTCTGACATGTCTGGTGAAG
 GGCTTCTATCCTAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGTCCAATGGCCAGCCAGAGAA
 CAATTACAAGACCACACCCCCTGTGCTGGACTCCGATGGCTCTTTCTTTCTGTATTCC
 AAGCTGACCGTGGATAAGTCTCGGTGGCAGCAAGGCAACGTGTTTTCTTGTTCGTG
 ATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACACAGAAGTCCCTGTCTCTGAGCCCCGGC
 TGA

SEQ ID NO: 7

TCCGACACCGGCAGACCCTTCGTGGAGATGTACAGCGAGATCCCCGAGATCA
 TTCACATGACCGAGGGCAGAGAGCTCGTGATCCCTTGTAGAGTGACCTCCCCAAC
 TCACCGTGACACTGAAGAAGTTTCCTCTGGATAACCCTCATCCCCGACGGCAAGAGGA
 TTATTTGGGACTCTAGAAAGGGCTTCATCATTAGCAACGCCACCTACAAGGAGATCG
 GACTGCTGACATGCGAGGCCACCGTGAACGGCCACCTCTACAAGACCAACTATCTG
 ACCCATAGACAGACCAATACCATCATCGACGTGGTGCTCTCCCCTAGCCACGGAATC
 GAGCTGAGCGTGGGCGAGAACTGGTGCTCAATTGCACCGCTAGAACAGAGCTCAA
 CGTGGGCATCGACTTCAACTGGGAATACCCCTCCTCCAAGCACCAACACAAGAAGC
 TCGTGAATAGAGATCTGAAGACCCAAAGCGGCAGCGAGATGAAGAAGTTTCTGAGC

AACTGACAATTGACGGCGTCACAAGAAGCGACCAAGGCCTCTATACATGCGCCGC
 CAGCAGCGGACTGATGACCAAGAAGAACAGCACCTTCGTGAGAGTGCACGAGAAA
 GATAAGACCCACACATGTCCCCCTTGCCCCGCCCCGAGCTGCTGGGAGGACCTAGC
 GTCTTTCTGTTCCCTCCTAAGCCCAAGGACACACTGATGATCTCCAGAACCCCCGAG
 GTGACATGCGTGGTTCGTGGACGTGTCCCACGAGGACCCCGAGGTGAAGTTCAATTG
 GTACGTCGACGGCGTGGAGGTGCACAATGCTAAGACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGT
 ACAACTCCACCTACAGAGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTCCATCAAGACTGGCTCA
 ACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGAGCAACAAGGCCCTCCCCGCCCTATCGAG
 AAGACCATTTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGAGAGCCCCAAGTGTATACTGCC
 TCCCAGCAGAGACGAGCTCACCAAAAACCAAGTGTCCCTCACATGTCTGGTCAAAG
 GCTTCTACCCCAGCGATATCGCCGTGGAGTGGGAAAGCAACGGCCAGCCCGAGAAC
 AACTACAAGACAACCCCTCCCGTGCTCGACAGCGACGGAAGCTTCTTTCTGTACAGC
 AAGCTGACCGTGGACAAGTCTAGATGGCAGCAAGGCAATGTCTTTAGCTGCAGCGT
 GATGCACGAGGCTCTGCACAATCACTACACCCAGAAGAGCCTCTCTCTGAGCCCCG
 GCTGA

SEQ ID NO: 8

TCCGACACCGGCAGACCCTTCGTGGAGATGTACAGCGAGATCCCCGAGATCA
 TTCACATGACCGAGGGCAGAGAGCTCGTGATCCCTTGTGAGTGACCTCCCCAACA
 TCACCGTGACACTGAAGAAATTTCTCTGGATACCCTCATCCCCGACGGCAAGAGGA
 TTATCTGGGACTCTAGAAAGGGCTTCATCATTAGCAACGCCACCTACAAGGAGATCG
 GACTGCTTACATGCGAGGCCACCGTGAACGGCCACCTCTACAAGACCAACTATCTG
 ACCCATAGACAGACCAATACCATCATTGACGTGGTTCTCTCCCCTTCTCACGGAATC
 GAGCTGAGCGTGGGCGAGAACTGGTGTCAATTGCACCGCTAGAACAGAGCTCAA
 CGTGGGCATCGACTTCAACTGGGAATACCCCTCCTCTAAGCACCAACACAAGAAAC
 TCGTGAATAGAGATCTGAAGACCCAAAGCGGCAGCGAGATGAAGAAATTTCTGAGC
 AACTGACAATTGACGGCGTCACAAGAAGCGACCAAGGCCTCTATACATGCGCCGC
 TAGCAGTGGACTGATGACCAAGAAAACAGCACCTTCGTGAGAGTGCACGAGAAAG
 ATAAGACCCACACATGTCCCCCTTGCCCCGCCCCGAGCTGCTTGGAGGTCCTAGCG
 TCTTTCTGTTCCCTCCAAAGCCCAAGGACACACTGATGATCTCCAGAACCCCCGAGG
 TGACATGCGTGGTTCGTGGACGTGTCCCACGAGGACCCCGAGGTGAAGTTCAATTGG
 TATGTTGACGGCGTGGAGGTGCACAATGCTAAGACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTA
 CAACTCCACCTACAGAGTGGTTTCCGTGCTGACCGTGCTCCATCAAGACTGGCTCAA
 CGGCAAGGAGTACAAGTGCAAAGTGAGCAACAAGGCCCTCCCCGCCCTATCGAGA
 AGACCATTTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGAGAGCCCCAAGTGTATACTGCCT
 CCCAGCAGAGACGAGCTCACCAAAAACCAAGTGTCCCTCACATGTCTGGTCAAAGG
 CTTCTACCCCAGCGATATCGCCGTGGAGTGGGAAAGCAACGGCCAGCCCGAGAACA
 ATTACAAGACAACCCCTCCCGTGCTCGACAGCGACGGAAGCTTCTTTCTGTACTCCA
 AGCTGACCGTGGACAAGTCTAGATGGCAGCAAGGCAATGTCTTTAGCTGCAGCGTG
 ATGCACGAGGCTCTGCACAATCACTACACCCAGAAGAGCCTCTCTCTGAGCCCCGGC
 TGA

SEQ ID NO: 9

TCCGACACCGGGAGACCGTTTGTAGAAATGTA CTCTGAAATTCCAGAAATTA
TTCACATGACTGAAGGACGAGAACTCGTAATCCC GTGCCGGGTAACATCACCGAAC
ATTACCGTTACTCTCAAGAAGTTCCCGTTGGACACTCTGATTCCAGACGGCAAGCGG
ATTATATGGGATTCACGAAAAGGCTTTATCATCAGCAACGCTACATATAAGGAGAT
AGGCCTCCTCACCTGCGAGGCCACAGTGAACGGACACCTTTACAAGACAAACTACC
TCACGCATCGCCAGACTAACACTATTATAGACGTTGTA CTCTCAGCCCTTCCCACGGAA
TAGAGCTCTCTGTTGGGGAAAAGCTTGTCTGAACTGCACGGCACGAACCGAACTCA
ACGTTGGTATTGATTTCAACTGGGAATACCCCTCTTCAAAGCACCAACATAAGAAGC
TCGTGAACAGGGACCTGAAGACGCAGAGTGGATCCGAAATGAAGAAATTTCTTTCA
ACTCTACAATCGACGGCGTTACCAGGAGCGATCAGGGGCTTTATACTTGCGCGGGCT
TCTTCTGGACTCATGACAAAAGAAAAACAGTACTTTCGTTTCGCGTCCATGAGAAAGAT
AAGACCCATACGTGCCACCTTGTCCAGCTCCGGAAC TTTTGGGCGGACCCAGCGTA
TTTCTTTTTCTCCCAAGCCGAAAGACACACTGATGATATCAAGAACTCCTGAAGTT
ACATGTGTTGTTGTTGACGTTAGTCATGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTAT
GTTGATGGAGTAGAGGTTCATAACGCGAAGACGAAGCCACGAGAAGAACAGTACA
ACAGCACGTATAGGGTGGTCAGTGTACTTACGGTACTCCACCAAGATTGGCTTAACG
GTAAGGAATACAAGTGTAAGTATCTAATAAGGCATTGCCGGCTCCGATTGAAAAG
ACAATCTCTAAGGCAAAGGCCAGCCGCGCGAGCCGCAAGTATATACATTGCCTCC
CTCAAGAGATGAGCTTACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACATGCCTTGTCAAAGGAT
TCTACCCTAGCGACATAGCCGTCGAATGGGAATCAAACGGTCAACCAGAGAACAAT
TATAAAACCACCCCCCGGTGCTTGATAGTGATGGCTCCTTTTTTCTGTATTCTAAGT
TGACGGTGGATAAGAGTCGGTGGCAACAGGGGAATGTATTTAGTTGCAGTGTGATG
CACGAGGCTCTTCATAACCACTACACACAAAAATCTTTGAGCTTGTCTCCAGGTTGA

SEQ ID NO: 10

TCCGACACCGGGAGACCGTTTGTAGAAATGTA CTCTGAAATTCCAGAAATTA
TCCACATGACTGAAGGACGAGAACTCGTAATCCC GTGCCGGGTAACATCACCGAAC
ATTACCGTTACTCTCAAGAAATTTCCCGTTGGACACTCTGATTCCAGACGGCAAGCGG
ATTATATGGGATTCACGAAAAGGCTTTATCATTAGCAACGCTACATATAAGGAGATA
GGCCTCCTGACCTGCGAGGCCACAGTGAACGGACACCTTTACAAGACAAACTACCT
CACGCATCGCCAGACTAACACTATTATAGACGTTGTA CTCTCAGCCCTTCCCACGGAA
AGAGCTCTCTGTTGGGGAAAAGCTTGTCTGAACTGCACGGCACGAACCGAACTCA
ACGTTGGTATTGATTTCAACTGGGAATACCCCTCTTCAAAGCACCAACATAAGAAAC
TCGTGAACAGGGACCTGAAGACGCAGAGTGGATCCGAAATGAAGAAATTTCTTTCA
ACTCTACAATCGACGGCGTTACCAGGAGCGATCAGGGGCTTTATACTTGCGCGGGCT
TCTTCCGGACTCATGACAAAAGAAAAACAGTACTTTCGTTTCGCGTCCATGAGAAAGAT
AAGACCCATACGTGCCACCTTGTCCAGCTCCGGAAC TTTTGGGCGGACCCAGCGTA
TTTCTTTTTCTCCCAAGCCGAAAGACACACTGATGATATCAAGAACTCCTGAAGTT
ACATGTGTTGTGGTTGACGTCAGTCATGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTAT
GTTGATGGAGTAGAGGTTCATAACGCGAAGACGAAGCCACGAGAAGAGCAGTACA

ACAGCACGTATAGGGTGGTCAGTGTACTTACGGTACTCCACCAAGATTGGCTTAACG
 GAAAGGAATACAAGTGTAAGTATCTAATAAGGCATTGCCGGCTCCGATTGAAAAG
 ACAATCTCTAAGGCAAAGGCCAGCCGCGCAGCCGCAAGTATATACATTGCCTCC
 CTCAAGAGATGAGCTTACCAAGAACCAGGTTTCTCTGACATGCCTTGTCAAAGGATT
 CTACCCTAGCGACATAGCCGTCGAATGGGAATCAAACGGTCAACCAGAGAACAATT
 AAAAAACACACCCCCGGTGCTTGATAGTGATGGCTCCTTTTTCTGTATTCTAAGTT
 GACGGTGGATAAGAGTCGGTGGCAACAGGGGAATGTATTTAGTTGCAGTGTGATGC
 ACGAGGCTCTTCATAACCACTACACACAAAAATCTTTGAGCTTGTCTCCAGGTTGA

SEQ ID NO: 11

AGCGACACCGGCCGCCCTTCGTGGAGATGTACAGCGAGATCCCCGAGATCA
 TCCACATGACCGAGGGCCGCGAGCTGGTGATCCCCTGCCGCGTGACCAGCCCCAAC
 ATCACCGTGACCCTGAAGAAGTTCCCCCTGGACACCCTGATCCCCGACGGCAAGCG
 CATCATCTGGGACAGCCGCAAGGGCTTCATCATCAGCAACGCCACCTACAAGGAGA
 TCGGCCTGCTGACCTGCGAGGCCACCGTGAACGGCCACCTGTACAAGACCAACTAC
 CTGACCCACCGCCAGACCAACACCATCATCGACGTGGTGCTGAGCCCCAGCCACGG
 CATCGAGCTGAGCGTGGGCGAGAAGCTGGTGCTGAACTGCACCGCCCCGACCGAGC
 TGAACGTGGGCATCGACTTCAACTGGGAGTACCCAGCAGCAAGCACCAGCACAAG
 AAGCTGGTGAACCGCGACCTGAAGACCCAGAGCGGCAGCGAGATGAAGAAGTTCCT
 GAGCACCTGACCATCGACGGCGTGACCCGCGAGCGACCAGGGCCTGTACACCTGCG
 CCGCCAGCAGCGGCCTGATGACCAAGAAGAACAGCACCTTCGTGCGCGTGCACGAG
 AAGGACAAGACCCACACCTGCCCCCCTGCCCCGCCCCGAGCTGCTGGGCGGCCCC
 CAGCGTGTTCCTGTTCCCCCACAAGCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGCACCCC
 CGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAGGACCCCGAGGTGAAGTTCA
 ACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCCGCGAGGA
 GCAGTACAACAGCACCTACCGCGTGGTGGAGCGTGTGACCGTGTGACCCAGGACT
 GGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGAGCAACAAGGCCCTGCCCGCCCC
 ATCGAGAAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCCCAGGTGTACAC
 CCTGCCCCCCAGCCGCGACGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGG
 TGAAGGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCC
 GAGAACAACCTACAAGACCAACCCCCCGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCT
 GTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCCGCTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCACT
 GCAGCGTGTGACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTG
 AGCCCCGGCTAA

Предпочтительно полинуклеотид, кодирующий полипептид афлиберцепта, представляет собой SEQ ID NO:11 или его вариант.

В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая афлиберцепт, обладает по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с любой из SEQ ID NO: 2-11, предпочтительно SEQ ID NO: 11. Предпочтительно белок, кодируемый нуклеотидной последовательностью, по существу сохраняет функциональную активность

белка, представленного SEQ ID NO:1.

Ранибизумаб является фрагментом (Fab) моноклонального антитела против VEGFA. Предпочтительно полипептид ранибизумаба может включать последовательности варибельной области тяжелой и легкой цепей, показанные как SEQ ID NO: 12 и 13, соответственно. Определяющие комплементарность области (CDR-области) показаны подчеркнутыми в каждой из последовательностей.

SEQ ID NO: 12

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGLEWVGVIN
 TYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPYYYGTSHWYF
 DVWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL
 TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT
 HL

SEQ ID NO: 13

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIIYFTSSLHS
 GVPSRFGSGSGTDFLTITSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFI
 FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSL
 STLTLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Последовательности варибельной области тяжелой и легкой цепи ранибизумаба могут включать полипептиды, показанные как SEQ ID NO: 12 или 13. Варианты могут обладать по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с SEQ ID NO: 12 или 13. Предпочтительно фрагмент или вариант по существу сохраняют функциональную активность последовательностей варибельной области тяжелой и легкой цепи, показанных как SEQ ID NO: 12 и 13.

Полипептиды тяжелой и легкой цепи ранибизумаба могут кодироваться любыми подходящими полинуклеотидными последовательностями. Полинуклеотидные последовательности, кодирующие тяжелые и легкие цепи, могут быть функционально связаны в выделенном полинуклеотиде. Например, полинуклеотидные последовательности, кодирующие тяжелые и легкие цепи, могут быть функционально связаны с одним и тем же промотором и отделены друг от друга участком внутренней посадки рибосомы (IRES) или полинуклеотидной последовательностью, кодирующей саморасщепляющийся полипептид.

Примеры полинуклеотидных последовательностей, кодирующих полипептиды тяжелой и легкой цепи ранибизумаба, соответственно, показаны как SEQ ID NO: 14 и 15.

SEQ ID NO: 14

GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGCGGCGGCCTGGTGCAGCCCGGCGGCAGC
 CTGCGCCTGAGCTGCGCCGCGGCTACGACTTCACCCACTACGGCATGAAGTGG
 GTGCGCCAGGCCCCCGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGGGCTGGATCAACACCTACAC
 CGGCGAGCCACCTACGCGCCGACTTCAAGCGCCGCTTCACTTACGCTGGACAC
 CAGCAAGAGCACCGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGCGCCGAGGACACCGCCG

TGTA C TACTGCGCCAAGTACCCCTACTACTACGGCACCAGCCACTGGTACTTCGACG
 TGTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGACCGTGAGCAGCGCCAGCACCAAGGGCCCCAGC
 GTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGGCGGCACCGCCGCCCTGGG
 CTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGAGCTGGAACAGCGGCG
 CCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACA
 GCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATC
 TGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCA
 AGAGCTGCGACAAGACCCACCTG

SEQ ID NO: 15

GACATCCAGCTGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACC
 GCGTGACCATCACCTGCAGCGCCAGCCAGGACATCAGCAACTACCTGAACTGGTAC
 CAGCAGAAGCCC GGCAAGGCCCCCAAGGTGCTGATCTACTTCACCAGCAGCCTGCA
 CAGCGGCGTGCCAGCCGCTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGA
 CCATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTACAGC
 ACCGTGCCCTGGACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAGCGCACCGTGGC
 CGCCCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCG
 CCAGCGTGGTGTGCTGCTGAACA ACTTCTACCCCCGCGAGGCCAAGGTGCAGTGG
 AAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGG
 ACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCTGAGCAAGGCCGAC
 TACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGAGCAGCCC
 CGTGACCAAGAGCTTCAACCGCGGCGAGTGC

Примеры выделенных полинуклеотидов и векторов AAV, кодирующих ранибизумаб, представлены, например, в WO2019/164854.

Бевацизумаб представляет собой моноклональное антитело против VEGFA. Предпочтительно полипептидная последовательность бевацизумаба может включать последовательности тяжелой и легкой цепи, показанные как SEQ ID NO: 16 и 17, соответственно. Определяющие комплементарность области (CDR-области) показаны подчеркнутыми в каждой из последовательностей.

SEQ ID NO: 16

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWVGVIN
TYTGEPTYAADEFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGSSHWYF
DVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL
 TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKT
 HTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
 EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
 GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD
 SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 17

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIIYFTSSLHS
 GVPSRFSGSGSGTDFLT LTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFI

FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS
STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Последовательности тяжелой и легкой цепи бевацизумаба могут включать полипептиды, показанные как SEQ ID NO: 16 или 17. Варианты могут обладать по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с SEQ ID NO: 16 или 17. Предпочтительно фрагмент или вариант по существу сохраняют функциональную активность последовательностей тяжелой и легкой цепи, показанных как SEQ ID NO: 16 и 17.

Примеры полинуклеотидных последовательностей, кодирующих полипептиды тяжелой и легкой цепи бевацизумаба, соответственно, показаны как SEQ ID NO: 18 и 19.

SEQ ID NO: 18

GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGCGGCCTGGTGCAGCCCGGCAGC
CTGCGCCTGAGCTGCGCCGCGAGCGGCTACACCTTACCAACTACGGCATGAACTGG
GTGCGCCAGGCCCCCGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGGGCTGGATCAACACCTACAC
CGGCGAGCCACCTACGCGCCGACTTCAAGCGCCGCTTACCTTACGCTGGACAC
CAGCAAGAGCACCGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGCGCCGAGGACACCGCCG
TGTACTACTGCGCCAAGTACCCCCACTACTACGGCAGCAGCCACTGGTACTTCGACG
TGTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGAGCAGCGCCAGCACCAAGGGCCCCAGC
GTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACAGCGGCGGCACCGCCGCCCTGGG
CTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGAGCTGGAACAGCGGCG
CCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCCGCGCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACA
GCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATC
TGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCA
AGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGCCCCCCTGCCCCGCCCCGAGCTGCTGGGC
GGCCCCAGCGTGTTCCTGTTCCCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGC
ACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAGGACCCCGAGGTGAA
GTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCCGCG
AGGAGCAGTACAACAGCACCTACCGCGTGGTGGAGCGTGTGACCGTGTGACCCAG
GACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGAGCAACAAGGCCCTGCCCGC
CCCCATCGAGAAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCCCAGGTGT
ACACCCTGCCCCCAGCCGCGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGC
CTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCA
GCCCCGAGAACAACACTACAAGACCACCCCCCGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCT
TCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCCGCTGGCAGCAGGGCAACGTGTTC
AGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACCCAGAAGAGCCTGAG
CCTGAGCCCCGGCAAG

SEQ ID NO: 19

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGAC
CGCGTGACCATCACCTGCAGCGCCAGCCAGGACATCAGCAACTACCTGAACTGGTA
CCAGCAGAAGCCCCGGCAAGGCCCCCAAGGTGCTGATCTACTTACCAGCAGCCTGC

ACAGCGGCGTGCCAGCCGCTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTG
 ACCATCAGCAGCCTGCAGCCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTACAG
 CACCGTGCCCTGGACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAGCGCACCGTGG
 CCGCCCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACC
 GCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACCTTCTACCCCCGCGAGGCCAAGGTGCAGTG
 GAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAG
 GACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCCTGACCCTGAGCAAGGCCGA
 CTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGAGCAGCC
 CCGTGACCAAGAGCTTCAACCGCGGCGAGTG

Полипептиды тяжелой и легкой цепи бевацизумаба могут кодироваться любыми подходящими полинуклеотидными последовательностями. Полинуклеотидные последовательности, кодирующие тяжелые и легкие цепи, могут быть функционально связаны в выделенном полинуклеотиде. Например, полинуклеотидные последовательности, кодирующие тяжелые и легкие цепи, могут быть функционально связаны с одним и тем же промотором и отделены друг от друга участком внутренней посадки рибосомы (IRES) или полинуклеотидной последовательностью, кодирующей саморасщепляющийся полипептид.

Пэгаптаниб представляет собой РНК аптамер, специфичный в отношении изоформы VEGF₍₁₆₅₎. Последовательность РНК пэгаптаниба показана как SEQ ID NO: 20.

SEQ ID NO: 20

GCGGAAUCAGUGAAUGCUUAUACAUCCGC

Полинуклеотидная последовательность пэгаптаниба может включать последовательность, показанную как SEQ ID NO: 20. Вариант может обладать по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с SEQ ID NO: 20. Предпочтительно фрагмент или вариант по существу сохраняют функциональную активность полинуклеотида, показанного как SEQ ID NO: 20.

Пример полинуклеотидной последовательности, кодирующей пэгаптаниб, показан как SEQ ID NO: 21.

SEQ ID NO: 21

CGCCTTAGTCACTTACGAATATGTAGGCG

Сигнальный пептид

Полинуклеотидная последовательность, кодирующая молекулу против VEGF, может также включать полинуклеотидную последовательность, кодирующую сигнальный пептид, который обеспечивает секрецию молекулы против VEGF из клетки.

Сигнальный пептид представляет собой короткий пептид, обычно длиной 5-30 аминокислот, как правило, присутствующий на N-конце большинства новых синтезированных белков, которые направляются по секреторному пути. Эти белки включают такие белки, которые либо находятся внутри некоторых органелл (например, эндоплазматического ретикулума, аппарата Гольджи или эндосом), либо секретируются

из клетки, а также трансмембранные белки.

Сигнальные пептиды обычно содержат коровую последовательность, которая представляет собой протяженный участок из гидрофобных аминокислот, который имеет тенденцию к формированию одиночной альфа-спирали. Сигнальный пептид может начинаться с короткого положительно заряженного участка аминокислот, который помогает обеспечивать правильную топологию полипептида во время транслокации. На конце сигнального пептида обычно присутствует участок аминокислот, который распознается и расщепляется сигнальной пептидазой. Сигнальная пептидаза может расщеплять во время или после завершения транслокации с образованием свободного сигнального пептида и зрелого белка. Затем свободные сигнальные пептиды расщепляются специфическими протеазами.

Сигнальный пептид обычно расположен на N-конце молекулы, хотя известны некоторые C-концевые сигнальные пептиды.

Сигнальные последовательности обычно имеют трехкомпонентную структуру, состоящую из гидрофобной коровой области (h-области), фланкируемой n- и c-областями. Последняя содержит консенсусный сайт расщепления для сигнальной пептидазы (СПазы). Обычно сигнальные последовательности отщепляются котрансляционно, получаемые в результате расщепленные сигнальные последовательности называются сигнальными пептидами.

Сигнальные последовательности могут быть обнаружены или предсказаны с помощью программных средств (см., например, <http://www.predisi.de/>). Известно большое количество сигнальных последовательностей, которые доступны в базах данных. Например, на сайте <http://www.signalpeptide.de> в базе данных перечислены 2109 подтвержденных сигнальных пептидов млекопитающих.

Предпочтительно сигнальный пептид может быть сигнальным пептидом CFH.

Иллюстративные полинуклеотидные последовательности, кодирующие сигнальный пептид CFH, показаны как SEQ ID NO: 22-31.

<u>SEQ</u>	<u>ID</u>	<u>NO:</u>	<u>22</u>	-
ATGAGACTTCTAGCAAAGATTATTTGCCTTATGTTATGGGCTA TTTGTGTAGCA				
<u>SEQ</u>	<u>ID</u>	<u>NO:</u>	<u>23</u>	-
ATGAGACTGCTGGCCAAGATCATCTGCCTGATGCTGTGGGCCA TCTGCGTGGCC				
<u>SEQ</u>	<u>ID</u>	<u>NO:</u>	<u>24</u>	-
ATGAGACTGCTCGCCAAGATCATTTGCCTGATGCTGTGGGCCA TCTGCGTGGCC				
<u>SEQ</u>	<u>ID</u>	<u>NO:</u>	<u>25</u>	-
ATGCGGCTGCTGGCCAAGATCATCTGCCTGATGCTGTGGGCCA TCTGCGTGGCA				
<u>SEQ</u>	<u>ID</u>	<u>NO:</u>	<u>26</u>	-
ATGCGGCTGCTCGCCAAGATCATTTGCCTGATGCTGTGGGCCA TCTGCGTGGCA				
<u>SEQ</u>	<u>ID</u>	<u>NO:</u>	<u>27</u>	-
ATGAGACTGCTCGCCAAGATCATCTGTCTGATGCTGTGGGCTA TCTGTGTCGCT				
<u>SEQ</u>	<u>ID</u>	<u>NO:</u>	<u>28</u>	-

ATGAGACTGCTCGCCAAGATCATTTGTCTGATGCTGTGGGCTA TCTGTGTCGCT

SEQ ID NO: 29 -

ATGCGCTTGCTGGCGAAGATAATCTGCCTGATGTTGTGGGCCA TATGCGTAGCC

SEQ ID NO: 30 -

ATGCGCTTGCTGGCGAAGATAATCTGCCTGATGTTGTGGGCCA TATGCGTAGCC

SEQ ID NO: 31 -

ATGCGCCTGCTGGCCAAGATCATCTGCCTGATGCTGTGGGCCA TCTGCGTGGCC

Система комплемента

Система комплемента является неотъемлемой частью гуморальной иммунной системы и участвует в процессах воспаления тканей, опсонизации клеток и цитолизе. Она обеспечивает защиту от микроорганизмов и опосредует удаление экзогенного и эндогенного клеточного дебриса из тканей хозяина.

Каскад системы комплемента состоит из трех путей активации. Все пути, в конечном счете, заканчиваются центральным расщеплением фактора C3 и образованием его активных фрагментов, C3a и C3b. C3a представляет собой анафилатоксин, который запускает ряд хемотаксических и провоспалительных реакций, таких как рекрутинг воспалительных клеток и повышение проницаемости микроциркуляторного русла, тогда как C3b отвечает за опсонизацию чужеродных поверхностей, ковалентно связанных с C3b. Опсонизация под воздействием активированных фрагментов C3 (C3b и iC3b) выполняет три основных функции: (i) удаление клеточного дебриса фагоцитирующими клетками (например, макрофагами или микроглией) и стимуляция адаптивной иммунной системы (В- и Т-клеток); (ii) усиление активации комплемента за счет образования связанной на поверхности C3-конвертазы; и (iii) сборка C5-конвертазы.

Сборка C5-конвертазы отвечает за расщепление C5, что приводит к образованию цитолитического мембраноатакующего комплекса (МАК), способного создавать перфорации в клеточной мембране, способствующие лизису клеток и элиминированию ненужных клеток. В результате всех этих действий каскад врожденного комплемента поддерживает и способствует функционированию нижестоящих механизмов иммунной системы, которые защищают целостность ткани хозяина. В совокупности, активация пути системы комплемента приводит к провоспалительному ответу, включающему формирование МАК, который опосредует лизис клеток, высвобождение хемокинов с привлечением воспалительных клеток к участку повреждения и повышение проницаемости капилляров, способствующее диапезу инфильтрирующих лейкоцитов. В физиологических условиях активация комплемента эффективно регулируется скоординированным действием растворимых и мембраносвязанных регуляторных молекул комплемента (CRM). Растворимые регуляторы комплемента, такие как C1-ингибитор, ингибитор анафилатоксинов, C4b-связывающий белок (C4BP), фактор комплемента H (CFH), фактор комплемента I (CFI), кластерин и витронектин, ограничивают действие комплемента в тканях человека во множестве участков каскадной реакции. Кроме того, каждая отдельная клетка защищена от атаки гомологичного

комплемента поверхностными белками, такими как рецептор комплемента 1 (CR1, CD35), мембранный кофакторный белок (MCP, CD46) и гликозилфосфатидилинозитол-заякоренные белки, такие как фактор ускорения распада (CD55) или молекула CD59. Следует отметить, что клетки и ткани хозяина, недостаточно защищенные от атаки комплемента, могут подвергаться неспецифичному лизису клеток.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к лечению или предупреждению опосредованного комплементом глазного нарушения. Например, опосредованное комплементом нарушение может быть нарушением, связанным с дефектом регуляции альтернативного пути и, в частности, с повышенной активностью цикла обратной связи с C3b комплемента и/или недостаточной активностью цикла расщепления C3b.

Настоящее изобретение включает применение негативного регулятора комплемента. Негативный регулятор комплемента может относиться к молекуле, которая ограничивает действие комплемента в одном или больше участков каскадной реакции. Например, негативный регулятор комплемента может быть ингибитором C1, ингибитором анафилатоксинов, C4b-связывающим белком (C4BP), фактором комплемента H (CFH), фактор H-подобным белком 1 (FHL1), фактором комплемента I (CFI), кластерином или витронектином. Негативный регулятор комплемента также может быть поверхностным белком, способным защищать клетки от атаки гомологичного комплемента; например, рецептором комплемента 1 (CR1, CD35), мембранным кофакторным белком (CD46) и гликозилфосфатидилинозитол-заякоренными белками, такими как фактор ускорения распада (CD55) или молекула CD59.

Предпочтительно негативный регулятор комплемента может быть ингибитором компонента каскада активации комплемента, например, ингибитором цикла комплемента с обратной связью с C3b.

Негативный регулятор комплемента может быть выбран из CFI, FHL1, CFH, CR1 и MCP или их варианта или фрагмента.

Негативный регулятор комплемента может быть выбран из CFI, FHL1 и CFH или их варианта или фрагмента.

Негативным регулятором комплемента может быть CFI или его вариант или фрагмент.

Негативным регулятором комплемента может быть FHL1 или его вариант или фрагмент.

Негативным регулятором комплемента может быть CFH или его вариант или фрагмент.

Негативным регулятором комплемента может быть CR1 или его вариант или фрагмент.

Негативным регулятором комплемента может быть MCP или его вариант или фрагмент.

Предпочтительно продукт может включать один или больше негативных

регуляторов комплемента.

Предпочтительно полинуклеотид может кодировать один или больше негативных регуляторов комплемента.

В некоторых вариантах осуществления перед введением продукта, полинуклеотида, вектора, клетки или фармацевтической композиции согласно изобретению субъект имеет низкие уровни (например, ниже, чем нормальные уровни) активности фактора комплемента I, например, низкие уровни активности фактора комплемента I в глазу и/или низкий уровень активности фактора комплемента I в сыворотке крови. Сниженный по сравнению с нормой уровень активности фактора комплемента I может быть обусловлен пониженной экспрессией нормально функционирующего фактора комплемента I или, по меньшей мере, частичной (например, гетерозиготной) экспрессией (на нормальном или субнормальном уровне) нефункционального или субфункционального варианта фактора комплемента I (такой субъект может нести одну или несколько копий ВМД-ассоциированного SNP, например, субъект может быть гомо- или гетерозиготным по одному из редких вариантов фактора комплемента I, дополнительного обсуждаемых ниже). Таким образом, субъект может иметь низкую концентрацию (например, ниже нормальной концентрации) фактора комплемента I в глазу и/или в сыворотке. Для субъекта-человека нормальный уровень активности фактора комплемента I (C3b-инактивирующей и iC3b-расщепляющей активности) может быть эквивалентен уровню, обеспечиваемому 30-40 мкг/мл фактора комплемента I в сыворотке крови субъекта. Таким образом, у субъекта с низкой активностью фактора комплемента I активность фактора комплемента I в сыворотке крови может соответствовать меньше чем 30 мкг/мл и больше чем 0 мкг/мл фактора комплемента I, например, 0-20 или 0-10 мкг/мл (такие диапазоны соответствуют концентрации фактора комплемента I в сыворотке крови, которая может охватывать субъекта, имеющего низкую концентрацию фактора комплемента I).

Таким образом, субъект, подлежащий лечению согласно изобретению, может страдать комплемент-опосредованным глазным нарушением, таким как ВМД, или может подвергаться риску развития такого нарушения. ВМД может быть влажной и/или сухой ВМД. Например, субъект может быть гомозиготным или гетерозиготным, восприимчивым к одному или больше SNP, ассоциированным с комплемент-опосредованным нарушением.

В некоторых вариантах осуществления субъект подвергается риску развития ВМД. Например, субъект может быть гомозиготным или гетерозиготным, восприимчивым к одному или больше SNP, ассоциированным с ВМД, например, к редким мутациям фактора комплемента I, связанным с прогрессирующей ВМД, которые обычно приводят к снижению уровня фактора комплемента I в сыворотке крови (Kavanagh et al. (2015) Hum Mol Genet 24: 3861-3870). В частности, субъект может иметь одну или две копии одного или более из следующих редких вариантов фактора комплемента I: rs144082872 (кодирующий P50A); 4:110687847 (кодирующий P64L); rs141853578 (кодирующий G119R); 4:110685721 (кодирующий V152M); 4:110682846 (кодирующий G162D);

4:110682801 (кодирующий N177D); rs146444258 (кодирующий A240G); rs182078921 (кодирующий G287R); rs41278047 (кодирующий K441R); и rs121964913 (кодирующий R474).

Изобретение может дополнительно включать определение, подвержен ли субъект риску развития комплемент-опосредованного нарушения (например, ВМД), например, путем определения того, является ли субъект гомозиготным или гетерозиготным, восприимчивым к одному или больше SNP, ассоциированным с комплемент-опосредованным нарушением (например, путем определения, является ли субъект гомозиготным или гетерозиготным по одному или больше редким вариантам фактора комплемента I, ассоциированным с ВМД, перечисленным выше).

В альтернативе субъект может иметь нормальный уровень активности или концентрации эндогенного фактора комплемента I, например, в глазу и/или сыворотке крови, и/или может не нести редкий вариант аллеля фактора комплемента I.

В некоторых вариантах осуществления введение продукта, полинуклеотида, вектора, клетки или фармацевтической композиции согласно изобретению повышает уровень C3b-инактивирующей активности и iC3b-расщепляющей активности в глазу субъекта. В других вариантах осуществления введение продукта, полинуклеотида, вектора, клетки или фармацевтической композиции согласно изобретению повышает уровень C3b-инактивирующей активности и iC3b-расщепляющей активности в глазу субъекта до уровня, который превышает нормальный уровень в глазу. В частности, уровень C3b-инактивирующей и iC3b-расщепляющей активности повышен в ПЭС глаза.

Следует понимать, что C3b-инактивирующая и iC3b-расщепляющая активность у субъекта после получения продукта согласно изобретению и/или экспрессии фактора комплемента I и фактор комплемента H-подобного белка 1 с полинуклеотида или вектора согласно изобретению может включать C3b-инактивирующую активность и iC3b-расщепляющую активность из эндогенного фактора комплемента I субъекта (т.е. фактора комплемента I субъекта, не представленного продуктом или продуцируемого в результате экспрессии с полинуклеотида или вектора), и C3b-инактивирующую и iC3b-расщепляющую активность, обеспечиваемую продуктом согласно изобретению или полученную в результате экспрессии с полинуклеотида или вектора согласно изобретению, в результате чего общий уровень C3b-инактивирующей и iC3b-расщепляющей активности у субъекта превышает нормальный уровень.

В некоторых вариантах осуществления уровень C3b-инактивирующей активности и iC3b-расщепляющей активности у субъекта, например, в глазу, повышен до уровня, который по меньшей мере на 5%, 10%, 15%, 20% или 25% выше нормального уровня.

В других вариантах осуществления уровень C3b-инактивирующей и iC3b-расщепляющей активности у субъекта, например, в глазу, повышен до уровня, который до двух раз превышает нормальный уровень или до 80%, 60%, 40% или на 20% выше нормального уровня.

Например, уровень C3b-инактивирующей и iC3b-расщепляющей активности у

субъекта, например, в глазу, может быть повышен до уровня, который на 5-100%, 5-80%, 5-60%, 5-40%, 5-20%, 10-100%, 10-80%, 10-60%, 10-40%, 10-20%, 15-100%, 15-80%, 15-60%, 15-40%, 15-20%, 20-100%, 20-80%, 20-60%, 20-40%, 25-100%, 25-80%, 25-60% или 25-40% выше нормального уровня.

В некоторых вариантах осуществления введение продукта, полинуклеотида, вектора, клетки или фармацевтической композиции согласно изобретению не приводит к обнаружимому повышению уровня С3b-инактивирующей и iС3b-расщепляющей активности в плазме/сыворотке крови субъекта. В других вариантах осуществления введение продукта, полинуклеотида, вектора, клетки или фармацевтической композиции согласно изобретению не приводит к обнаружимому повышению уровня С3b-инактивирующей активности и iС3b-расщепляющей активности в плазме/сыворотке крови субъекта до уровня выше нормального уровня.

В предыдущем разделе, за исключением случаев, когда это явно не применимо, ссылка на фактор комплемента I и С3b-инактивирующую активность и iС3b-расщепляющую активность может быть заменена фактором комплемента H или фактор комплемента H-подобным белком 1, а также способностью действовать в качестве кофактора для опосредуемого фактором комплемента I расщепления С3b и увеличивать скорость диссоциации С3-конвертазы и С5-конвертазы соответственно. В некоторых вариантах осуществления перед введением продукта, полинуклеотида, вектора, клетки или фармацевтической композиции согласно изобретению субъект имеет низкие уровни (например, ниже, чем нормальные уровни) фактора комплемента H, например, низкие уровни фактора комплемента H в глазу и/или низкие уровни фактора комплемента H в сыворотке крови. У человека нормальный уровень фактора комплемента H может составлять около 200-500 мкг/мл в сыворотке крови субъекта. Таким образом, у субъекта с низким уровнем фактора комплемента H уровни в сыворотке могут быть ниже 200 мкг/мл и выше 0 мкг/мл, такие как 0-100 мкг/мл. В альтернативе субъект может иметь нормальный уровень эндогенного фактора комплемента H, например, в глазу и/или в сыворотке крови.

Фактор комплемента I (CFI)

Фактор комплемента I (Фактор I, CFI), также известный как инактиватор С3b/C4b, является белком, кодируемым у человека геном CFI.

Фактор комплемента I представляет собой сериновую протеазу, которая циркулирует в зимоген-подобном состоянии (Roversi et al. (2011) PNAS 108: 12839-12844) в концентрации ~35 мкг/мл (Nilsson et al. (2011) Mol Immunol 48: 1611-1620). Фактор комплемента I, белок, который представляет собой сильно N-гликозированный гетеродимер, состоящий из двух полипептидных цепей, соединенных одной дисульфидной связью. Тяжелая цепь (50 кДа) включает N-концевую область; домен FI мембраноатакующего комплекса (FIMAC); CD5-подобный домен или богатый цистеином домен фагоцитарного рецептора (SRCR); два домена рецептора липопротеинов низкой плотности (LDLr); и C-концевую область с неизвестной функцией, которая представляет

собой участок вариабельности последовательности у разных видов (Roversi et al. (2011) PNAS 108: 12839-12844). Легкая цепь (38 кДа) содержит домен сериновой протеазы (SP) с консервативными каталитическими остатками (Goldberger et al. (1987) J Biol Chem 262: 10065-10071).

Фактор комплемента I инактивирует C3b, расщепляя его на iC3b, C3d и C3dg, и аналогичным образом C4b, на C4c и C4d. Для правильного выполнения своих функций фактор комплемента I требует присутствия белков-кофакторов, таких как C4b-связывающий белок (C4BP), фактор комплемента H (CFH), рецептор комплемента 1 (CR1/CD35) и мембранный кофакторный белок (MCP/CD46) (Degn et al. (2011) Am J Hum Genet 88: 689-705).

iC3b не способен связываться с фактором В и поэтому не может поддерживать амплификацию каскада комплемента или активацию по альтернативному пути. Следовательно, после расщепления C3b до iC3b не происходит ни инициации альтернативного пути, ни активации терминального каскада комплемента.

iC3b способен оказывать провоспалительное действие посредством связывания и активации рецептора комплемента 3 (CR3) (CD11b/CD18) на полиморфноядерных лейкоцитах (в основном нейтрофилах), NK-клетках и мононуклеарных фагоцитах, таких как макрофаги.

Фактор комплемента I способен процессировать iC3b в C3dg посредством протеазной активности, требующей кофактора, CR1. C3d, g не может связываться с CR3. Поскольку реакция iC3b с рецептором комплемента CR3 является основным механизмом, с помощью которого активация комплемента вызывает воспаление, расщепление iC3b до C3dg необходимо для уменьшения вызванного комплементом воспаления (Lachmann (2009) Adv. Immunol. 104: 115-149).

Уникальная способность фактора комплемента I одновременно вызывать расщепление C3b до iC3b, а также ускорять расщепление iC3b, в сочетании с его относительно низкой концентрацией в сыворотке крови человека, со значением в отношении количества, которое требуется доставить для терапевтической эффективности, делает его особенно предпочтительной мишенью.

В некоторых вариантах осуществления полипептид фактора комплемента I способен расщеплять C3b до неактивного продукта расщепления. Например, полипептид фактора комплемента I может быть способен расщеплять C3b до iC3b.

В некоторых вариантах осуществления полипептид фактора комплемента I способен процессировать iC3b до неактивного продукта расщепления. Например, полипептид фактора комплемента I может быть способен процессировать iC3b до C3dg.

В предпочтительных вариантах осуществления полипептид фактора комплемента I способен расщеплять C3b до iC3b и процессировать iC3b до C3dg.

Предпочтительно фрагмент или вариант фактора комплемента I может сохранять по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 100% C3b-инактивирующей и iC3b-расщепляющей активности нативного фактора комплемента I.

C3b-инактивирующая и iC3b-расщепляющая активность фактора комплемента I или его фрагмента или производного можно определять с помощью любого подходящего способа, известного специалисту в данной области. Например, измерение протеолитической активности фактора комплемента I описано в публикации Hsiung et al. (Biochem. J. (1982) 203: 293-298). Гемолитический и конглотинационный анализы активности CFI описаны в публикации Lachmann PJ & Hobart MJ (1978) "Complement Technology", в Handbook of Experimental Immunology 3rd edition Ed DM Weir Blackwells Scientific Publications Chapter 5A p17. Более подробное описание, также включающее протеолитический анализ, представлено Harrison RA (1996) в "Weir's Handbook of Experimental Immunology" 5th Edition Eds; Herzenberg Leonore A'Weir DM, Herzenberg Leonard A & Blackwell C Blackwells Scientific Publications Chapter 75 36-37. Реакция конглотинации обладает высокой чувствительностью и может использоваться для обнаружения первого (двойного) расщепления, превращающего фиксированный C3b в iC3b, и приобретения реактивности с конглотинином; и для обнаружения конечного расщепления до C3dg, начинающегося с фиксированного iC3b и идущего до потери реактивности с конглотинином. Гемолитический анализ используется для превращения C3b в iC3b, а протеолитический анализ обнаруживает все фрагменты.

В некоторых вариантах осуществления фактор комплемента I представляет собой человеческий фактор комплемента I.

Примером человеческого белка фактора комплемента I является белок фактора комплемента I человека, имеющий регистрационный номер UniProtKB P05156. Эта представленная в качестве примера последовательность имеет длину 583 аминокислоты (раскрыта как SEQ ID NO: 32), из которых аминокислоты 1-18 образуют сигнальную последовательность.

В некоторых вариантах осуществления аминокислотной последовательностью фактора комплемента I является SEQ ID NO: 32. В других вариантах осуществления аминокислотной последовательностью фактора комплемента I является последовательность, раскрытая как положения 19-583 в SEQ ID NO: 32. Предпочтительно вариант или фрагмент по существу сохраняют функциональную активность белка, представленного SEQ ID NO: 32

MKLLHVFLFLCFHLRFCKVITYTSQEDLVEKKCLAKKYTHLSCDKVFCQPWQR
 CIEGTCVCKLPYQCPKNGTAVCATNRRSFPTYCQQKSLECLHPGTKFLNNGTCTAEGKF
 SVSLKHGNTDSEGIVEVKLVQDKTMFICKSSWSMREANVACLDLGFQQGADTQRRFK
 LSDLSINSTECLHVHCRGLETSLAECTFTKRRTMGYQDFADVVCYTQKADSPMDDFFQC
 VNGKYISQMKACDGINDCGDQSDDELCKACQGKGFHCKSGVCIPSQYQCNGEVDCTIG
 EDEVGCAGFASVTQEETEILTADMDAERRRIKSLPKLSCGVKNRMHIRRKRIVGGKRA
 QLGDLPWQVAIKDASGITCGGIYIGGCWILTAANCLRASKTHRYQIWTTVVDWIHPDLK
 RIVIEYVDRIIFHENYNAGTYQNDIALIEMKKDGNKKDCELPRSIPACVPWSPYLFQPNDT
 CIVSGWGREKDNERVFSLQWGEVKLISNCSKFYGNRFYEKEMECAGTYDGSIDACKGD
 SGGPLVCM DANNTYVWGVVSWGENCGKPEFPGVYTKVANYFDWISYHVGRPFISQY

NV

(SEQ ID NO: 32)

В некоторых вариантах осуществления аминокислотной последовательностью фактора комплемента I является SEQ ID NO: 33, который соответствует Вступлению NCBI № NP_000195. В других вариантах осуществления аминокислотной последовательностью фактора комплемента I является последовательность, раскрытая как положения 19-583 в SEQ ID NO: 33.

MKLLHVFLFLCFHLRFCKVITYTSQEDLVEKKCLAKKYTHLSCDKVFCQPWQR
 CIEGTCVCKLPYQCPKNGTAVCATNRRSFPTYCQQKSLECLHPGTFKLNNGTCTAEGKF
 SVSLKHGNTDSEGIVEVKLVDQDKTMFICKSSWSMREANVACLDLGFQQGADTQRRFK
 LSDLSINSTECLHVHCRGLETSLAECTFTKRRRTMGYQDFADVVCYTQKADSPMDDFFQC
 VNGKYISQMKACDGINDCGDQSDDELCKACQGKGFHCKSGVCIPSQYQCNGEVDCITG
 EDEVGCAGFASVAQEETEILTADMDAERRRIKSLPKLSCGVKNRMHIRRKRIVGGKRA
 QLGDLPWQVAIKDASGITCGGIYIGGCWILTAHCLRASKTHRYQIWTTVVDWIHPDLK
 RIVIEYVDRIIFHENYNAGTYQNDIALIEMKKDGNKKDCELPRSIPACVPWSPYLFQPNNT
 CIVSGWGREKDNERVFSLQWGEVKLISNCSKFYGNRFYEKEMECAGTYDGSIDACKGD
 SGGPLVCM DANNVTYVWGVVSWGENCGKPEFFGVYTKVANYFDWISYHVGRPFISQY
 NV

(SEQ ID NO: 33)

Примером нуклеотидной последовательности дикого типа, кодирующей фактор комплемента I, является нуклеотидная последовательность, имеющая номер доступа в NCBI NM_000204, раскрытая в настоящем документе как SEQ ID NO: 34.

ATGAAGCTTCTTCATGTTTTCTGTTATTTCTGTGCTTCCACTTAAGGTTTTGC
 AAGGTCACTTATACATCTCAAGAGGATCTGGTGGAGAAAAAGTGCTTAGCAAAAAA
 ATATACTCACCTCTCCTGCGATAAAGTCTTCTGCCAGCCATGGCAGAGATGCATTGA
 GGGCACCTGTGTTTGTAACCTACCGTATCAGTGCCCAAAGAATGGCACTGCAGTGTG
 TGCAACTAACAGGAGAAGCTTCCCAACATACTGTCAACAAAAGAGTTTGGAATGTC
 TTCATCCAGGGACAAAAGTTTTTAAATAACGGAACATGCACAGCCGAAGGAAAGTTT
 AGTGTTCCTTGAAGCATGGAAATACAGATTCAGAGGGAATAGTTGAAGTAAAAC
 TGTGGACCAAGATAAGACAATGTTTCATATGCAAAAGCAGCTGGAGCATGAGGGAAG
 CCAACGTGGCCTGCCTTGACCTTGGGTTTCAACAAGGTGCTGATACTCAAAGAAGGT
 TTAAGTTGTCTGATCTCTCTATAAATCCACTGAATGTCTACATGTGCATTGCCGAGG
 ATTAGAGACCAGTTTGGCTGAATGTACTTTTACTAAGAGAAGAAGTATGGGTTACCA
 GGATTTGCTGATGTGGTTTGTATACACAGAAAGCAGATTCTCCAATGGATGACTT
 CTTTCAGTGTGTGAATGGGAAATACATTTCTCAGATGAAAGCCTGTGATGGTATCAA
 TGATTGTGGAGACCAAAGTGATGAACTGTGTTGTAAGCATGCCAAGGCAAAGGCT
 TCCATTGCAAATCGGGTGTGTTGCATTCCAAGCCAGTATCAATGCAATGGTGAGGTGG
 ACTGCATTACAGGGGAAGATGAAGTTGGCTGTGCAGGCTTTGCATCTGTGGCTCAAG
 AAGAAACAGAAATTTTGACTGCTGACATGGATGCAGAAAGAAGACGGATAAAATCA
 TTATTACCTAAACTATCTTGTGGAGTTAAAAACAGAATGCACATTCGAAGGAAACG

AATTGTGGGAGGAAAGCGAGCACAACCTGGGAGACCTCCCATGGCAGGTGGCAATTA
 AGGATGCCAGTGGAATCACCTGTGGGGGAATTTATATTGGTGGCTGTTGGATTCTGA
 CTGCTGCACATTGTCTCAGAGCCAGTAAACTCATCGTTACCAAATATGGACAACAG
 TAGTAGACTGGATACACCCCGACCTTAAACGTATAGTAATTGAATACGTGGATAGA
 ATTATTTTCCATGAAAAC TACAATGCAGGCACTTACCAAATGACATCGCTTTGATT
 GAAATGAAAAAAGACGGAAACAAAAAAGATTGTGAGCTGCCTCGTTCATCCCTGC
 CTGTGTCCCCTGGTCTCCTTACCTATTCCAACCTAATGATACATGCATCGTTTCTGGC
 TGGGGACGAGAAAAAGATAACGAAAGAGTCTTTTCACTTCAGTGGGGTGAAGTTAA
 ACTAATAAGCAACTGCTCTAAGTTTTACGGAAATCGTTTCTATGAAAAAGAAATGGA
 ATGTGCAGGTACATATGATGGTTCATCGATGCCTGTAAAGGGGACTCTGGAGGCC
 CTTAGTCTGTATGGATGCCAACAAATGTGACTTATGTCTGGGGTGTGTGAGTTGGGG
 GGAAAACTGTGGAAAACAGAGTTCCAGGTGTTTACACCAAAGTGGCCAATTATT
 TTGACTGGATTAGCTACCATGTAGGAAGGCCTTTTATTTCTCAGTACAATGTATAA

(SEQ ID NO: 34)

В некоторых вариантах осуществления нуклеотидные последовательности фактора комплемента I, применяемые в изобретении, являются кодон-оптимизированными.

Предпочтительной нуклеотидной последовательностью, кодирующей фактор комплемента I, является нуклеотидная последовательность, показанная как SEQ ID NO: 35.

ATGAAACTGCTGCATGTCTTCCTCCTCTTCCTGTGCTTCCACCTCCGTTTCTGT
 AAAGTCACCTACACTAGCCAGGAGGATCTGGTGGAGAAGAAATGCCTGGCCAAGAA
 GTATACCCACCTGAGCTGCGACAAAGTGTTCTGCCAGCCCTGGCAACGCTGCATTGA
 AGGTA CTTGTGTGTGCAAGCTGCCCTACCAGTGCCCCAAGAACGGCACGGCCGTGT
 GTGCCACCAACAGGAGGAGCTTCCCCACCTACTGCCAGCAGAAGAGCCTGGAATGC
 CTCCACCCTGGCACCAAGTTTCTGAACAACGGGACCTGCACAGCCGAGGGGAAATT
 CAGCGTCTCCCTCAAGCACGGCAATACAGACTCCGAGGGCATTGTGGAAGTGAAGC
 TGGTGGACCAGGACAAGACCATGTTTCATCTGCAAAAGCAGCTGGTCCATGCGGGAG
 GCCAATGTGCGCTGCCTGGACCTGGGCTTCCAGCAGGGCGCTGATACACAGCGCCG
 CTTTAAACTCAGTGACCTCAGCATCAACAGCACTGAGTGTCTGCACGTGCACTGCCG
 GGGCCTGGAGACCAGCCTGGCTGAGTGCACCTTACCAAGCGCAGGACCATGGGCT
 ACCAGGATTTTGCAGATGTGGTCTGCTACACCCAGAAGGCAGACAGCCCCATGGAT
 GACTTCTTCCAGTGTGTCAATGGCAAGTACATTTCCAGATGAAGGCTTGTGACGGG
 ATCAATGATTGCGGGGATCAGAGCGATGAGCTCTGCTGCAAGGCCTGCCAAGGGAA
 GGGCTTTCACTGTAAGTCTGGGGTGTGCATCCCTTCTCAGTATCAGTGCAACGGAGA
 GGTGGACTGCATCACTGGGGAGGACGAGGTGGGCTGTGCTGGCTTCGCCTCTGTGG
 CCCAGGAGGAGACAGAGATCCTCACAGCTGACATGGATGCAGAGCGGCGGCATC
 AAGAGTCTGCTCCCAAAGCTCTCCTGCGGCGTTAAGAATCGCATGCACATCCGGAG
 GAAGCGGATCGTTGGAGGCAAACGGGCTCAGCTGGGGGACTTGCCGTGGCAGGTGG
 CCATCAAAGATGCCTCCGGAATCACCTGTGGTGGCATCTACATCGGCGGCTGCTGGA
 TCCTGACCGCCGCCACTGCCTTCGGGCCAGCAAGACTCACCGCTACCAGATCTGGA

CCACCGTGGTGGATTGGATTACCCCCGACCTGAAGAGGATTGTCATTGAGTATGTCCG
ACCGCATCATCTTCCATGAAAАCTACAATGCCGGGACGTATCAGAACGACATCGCC
CTCATCGAGATGAAGAAGGATGGGAACAAGAAGGACTGTGAGCTGCCTCGCTCCAT
CCCCGCCTGTGTACCATGGTCTCCGTACCTGTTCCAGCCAAATGACACATGCATCGT
GAGCGGCTGGGGCCGCGAGAAAGACAACGAGAGGGTCTTCTCCCTGCAGTGGGGTG
AAGTCAAGCTGATCAGCAACTGCTCCAAGTTCTACGGCAACCGCTTCTATGAGAAG
GAGATGGAGTGCGCCGGCACCTATGACGGCAGCATTGACGCGTGCAAGGGAGACAG
TGGGGGCCCCCTGGTCTGCATGGACGCCAACAATGTGACCTACGTGTGGGGAGTTGT
GTCCTGGGGCGAGAАCTGTGGCAAGCCTGAGTTCGGGGCGTGTACACAAAGGTGG
CAAАCTATTTTGACTGGATCTCCTATCACGTTGGCAGGCCCTTCATTTACAGTACA
ACGTA

(SEQ ID NO: 35)

Другим примером кодон-оптимизированной нуклеотидной последовательности, кодирующей фактор комплемента I, является SEQ ID NO: 36.

ATGAAGCTGCTGCATGTCTTTCTGCTGTTTCTGTGCTTCCATCTGCGGTTCTGT
AAAGTGACCTATACTAGCCAGGAGGATCTGGTGGAGAAGAAGTGTCTGGCCAAGAA
GTACACACACCTGAGCTGCGACAAGGTGTTCTGTGAGCCTTGGCAGCGGTGCATCGA
GGGCACCTGCGTGTGCAAGCTGCCTTACCAGTGCCCAAAGAACGGCACCGCCGTGT
GCGCCACAAATCGGAGATCTTTTCCAACATATTGCCAGCAGAAGAGCCTGGAGTGT
CTGCACCCCGGCACCAAGTTCCTGAACAATGGCACCTGCACAGCCGAGGGCAAGTT
TTCTGTGAGCCTGAAGCACGGCAACACAGATAGCGAGGGCAGCAGTGGAGGTGAAGC
TGGTGGACCAGGATAAGACCATGTTTATCTGTAAGAGCTCCTGGTCCATGAGGGAG
GCAAACGTGGCATGCCTGGATCTGGGATTCCAGCAGGGAGCAGACACACAGAGGGC
CTTTAAGCTGTCCGACCTGTCTATCAATAGCACCGAGTGCCTGCACGTGCACTGTAG
GGGCCTGGAGACATCCCTGGCAGAGTGCACCTTCACAAAGCGGAGAACCATGGGCT
ACCAGGACTTTGCCGACGTGGTGTGCTATACCCAGAAGGCCGATAGCCCCATGGAC
GATTTCTTTCAGTGCCTGAACGGCAAGTATATCTCCAGATGAAGGCCTGCGACGGC
ATCAATGACTGTGGCGATCAGTCTGACGAGCTGTGCTGTAAGGCCTGTCAGGGCAA
GGGCTTCCACTGCAAGAGCGGCGTGTGCATCCCTTCCAGTACCAGTGCAACGGCG
AGGTGGATTGTATCACAGGAGAGGACGAAGTGGGATGCGCAGGATTTGCATCTGTG
GCACAGGAGGAGACAGAGATCCTGACAGCCGACATGGATGCCGAGAGGGCGCCGGA
TCAAGTCTCTGCTGCCTAAGCTGAGCTGTGGCGTGAAGAATCGGATGCACATCAGA
AGGAAGCGCATCGTGGGAGGCAAGAGGGCACAGCTGGGCGATCTGCCATGGCAGG
TGGCCATCAAGGACGCCTCTGGCATCACCTGCGGCGGCATCTACATCGGAGGATGTT
GGATCCTGACCGCAGCACACTGCCTGAGAGCAAGCAAGACACACAGGTATCAGATC
TGGACCACAGTGGTGGATTGGATCCACCCAGACCTGAAGAGAATCGTGATCGAGTA
CGTGGATAGGATCATCTTTCACGAGAАCTACAATGCCGGCACATATCAGAACGACA
TCGCCCTGATCGAGATGAAGAAGGATGGCAATAAGAAGGACTGTGAGCTGCCCAGA
TCCATCCCTGCATGCGTGCCATGGAGCCCCATCTGTTCCAGCCCAACGATACCTGC
ATCGTGTCCGGATGGGGAAGGGAGAAGGACAATGAGCGGGTGTTTTCTCTGCAGTG

GGGCGAGGTGAAGCTGATCTCCAACCTGTTCTAAGTTCTACGGCAATAGGTTTTATGA
GAAGGAGATGGAGTGCGCCGGCACCTACGATGGCAGCATCGACGCCTGTAAGGGCG
ATTCGGAGGACCACTGGTGTGCATGGACGCAAACAATGTGACATACGTGTGGGGA
GTGGTGTCTCTGGGGAGAGAACTGCGGCAAGCCAGAGTTCCCCGGCGTATATACCAA
GGTGGCCAATTATTTTGATTGGATTTCCCTACCACGTTCGGCAGGCCCTTTATTTCCCAG
TATAATGTCTAA

(SEQ ID NO: 36)

В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая фактор комплемента I, обладает по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с SEQ ID NO: 34, 35 или 36, предпочтительно SEQ ID NO: 35. Предпочтительно, белок, кодируемый нуклеотидной последовательностью, по существу сохраняет функциональную активность белка, представленного SEQ ID NO: 34, 35 или 36.

В других вариантах осуществления нуклеотидной последовательностью, кодирующей фактор комплемента I, является SEQ ID NO: 34, 35 или 36, предпочтительно SEQ ID NO: 35.

В других вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая фактор комплемента I, обладает по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с положениями 55-1752 SEQ ID NO: 34, 35 или 36, предпочтительно SEQ ID NO: 35. Предпочтительно белок, кодируемый нуклеотидной последовательностью, по существу сохраняет функциональную активность белка, представленного SEQ ID NO: 32 или 33.

В других вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая фактор комплемента I, представляет собой положения 55-1752 SEQ ID NO: 34, 35 или 36, предпочтительно SEQ ID NO: 35.

В других вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая фактор комплемента I, кодирует аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с SEQ ID NO: 32 или 33. Предпочтительно, где аминокислотная последовательность по существу сохраняет функциональную активность белка, представленного SEQ ID NO: 32 или 33.

В других вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая фактор комплемента I, кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32 или 33.

В другом варианте осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая фактор комплемента I, кодирует аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичностью с положениями 19-583 SEQ ID NO: 32 или 33. Предпочтительно, где аминокислотная последовательность по существу сохраняет функциональную активность белка, представленного SEQ ID NO: 32 или 33.

В других вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая фактор комплемента I, кодирует аминокислотную последовательность положений 19-583 SEQ ID NO: 32 или 33.

Преимущество изобретения состоит в том, что фактор комплемента I особенно сложно получать в форме очищенного белка. Таким образом, авторы изобретения предложили способ модулирования системы комплемента, например, позволяющий лечить возрастную макулодистрофию (ВМД), посредством введения фактора комплемента I в форме вектора на основе AAV, включающего нуклеотидную последовательность, кодирующую фактор комплемента I. Вектор на основе AAV можно вводить в интересующий участок, например, глаз, чтобы обеспечить трансляцию полипептида фактора комплемента I *in situ*.

Фактор комплемента Н (CFH)

Фактор комплемента Н (Фактор Н, CFH) является белком регуляции комплемента.

Фактор комплемента Н представляет собой большой (155 кДа), растворимый гликопротеин, который присутствует в плазме крови человека в типичной концентрации 200-300 мкг/мл (Накобыан et al. (2008) 49(5): 1983-90). Основная функция фактора комплемента Н состоит в регуляции альтернативного пути системы комплемента.

Фактор комплемента Н обеспечивает кофакторную активность для опосредованного фактором комплемента I расщепления C3b. Фактор комплемента Н также увеличивает скорость диссоциации комплекса C3bBb (C3-конвертаза) и комплекса (C3b)NBb (C5-конвертаза) и, таким образом, уменьшает активность альтернативного пути комплемента.

Фактор комплемента Н состоит из 20 модулей белка контроля комплемента (ССР) (также называемых короткими консенсусными повторами или суши-доменами), соединенных друг с другом короткими линкерами (длиной от трех до восьми аминокислотных остатков) и расположенных продольно в конфигурации "голова к хвосту". Каждый из модулей ССР состоит приблизительно из 60 аминокислот с четырьмя остатками цистеина, связанными дисульфидными связями в конфигурации 1-3 2-4, и гидрофобного кодра, сформированного вокруг практически неизменяющегося остатка триптофана. Модули ССР имеют нумерацию от 1-20 (от N-конца белка). Модули ССР 1-4 и ССР 19-20 связываются с C3b, тогда как модули ССР 7 и ССР 19-20 связываются с GAG и сиаловой кислотой (Schmidt et al. (2008) Journal of Immunology 181: 2610-2619).

Было показано, что генотерапия с применением фактора комплемента Н может снижать тяжесть ВМД-подобной патологии, индуцированной у мышей (Cashman et al. (2015) J. Gene Med. 17: 229-243). Мышам субретинально совместно вводили: (i) аденовирусный вектор, экспрессирующий компонент C3 комплемента, который, как было показано ранее, воспроизводит многие признаки патологии ВМД у человека; и (ii) аденовирусный вектор, экспрессирующий фактор комплемента Н. По сравнению с контрольными животными, получавшими GFP вместо фактора комплемента Н, у мышей, трансдуцированных фактором комплемента Н, наблюдали снижение пролиферации

эндотелиальных клеток на 91% и ослабление атрофии ПЭС на 69%. Электроретинография показала улучшение функции сетчатки у мышей, получавших фактор комплемента Н, а иммуноцитохимия родопсина и RPE65 согласовывалась со спасением фоторецепторов и ПЭС у таких животных.

В некоторых вариантах осуществления полипептид фактора комплемента Н или его фрагмент или вариант способны действовать в качестве кофактора для опосредованного фактором комплемента I расщепления C3b. В некоторых вариантах осуществления полипептид фактора комплемента Н или его фрагмент или вариант способны повышать скорость диссоциации C3-конвертазы и C5-конвертазы.

В предпочтительных вариантах осуществления полипептид фактора комплемента Н или его фрагмент или вариант способны действовать в качестве кофактора для опосредованного фактором комплемента I расщепления C3b и увеличивать скорость диссоциации C3-конвертазы и C5-конвертазы.

Кофакторную активность и активность ускорения диссоциации фактора комплемента Н или его фрагмента или производного можно определять с помощью любого подходящего способа, известного специалисту в данной области. Например, измерение кофакторной активности фактора комплемента Н описано в публикации Sanchez-Corral, P., et al., 2002. *The American Journal of Human Genetics*, 71(6), стр. 1285-1295, и измерение активности ускорения диссоциации фактора комплемента Н описано в публикации Wong, E.K., et al., 2014. *Journal of the American Society of Nephrology*, 25(11), стр. 2425-2433.

В некоторых вариантах осуществления фактор комплемента Н является человеческим фактором комплемента Н.

Примером человеческого белка фактора комплемента Н является человеческий белок фактора комплемента Н, имеющий регистрационный номер в UniProtKB P08603. Эта представленная в качестве примера последовательность имеет длину 1231 аминокислота (раскрыта как SEQ ID NO: 37), из которых аминокислоты 1-18 образуют сигнальную последовательность.

В некоторых вариантах осуществления аминокислотной последовательностью фактора комплемента Н является SEQ ID NO: 37. В других вариантах осуществления аминокислотная последовательность фактора комплемента Н представляет собой положения 19-1231 SEQ ID NO: 37. Предпочтительно вариант или фрагмент по существу сохраняют функциональную активность белка, представленного SEQ ID NO: 37

MRLLAKIIICLMLWAICVAEDCNELPPRRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPG
YRSLGNVIMVCRKGEWVALNPLRKCQKRPCGHPGDTFPGTFTLTGGNVFEYGVKAVYT
CNEG YQLLGEINYRECDTDGWTNDIPICEVVKCLPVTAPENGKIVSSAMEPDREYHFGQ
AVRFVCNSGYKIEGDEEMHCSDDGFWFSKEKPKCVEISCKSPDVINGSPISQKIYKENERF
QYKCNMGYEYSERGDVCTESGWRPLPSCEEKSCDNPIYIPNGDYSPLRIKHRTGDEITY
QCRNGFY PATRGNTAKCTSTGWIPAPRCTLKPCDYPDIKHGGLYHENMRRPYFPVAVG
KYYSYYCDEHFETPSGSYWDHINCTQDGWSPA VPCLRKCYFPYLENGYNQNYGRK FV

QGKSIDVACHPGYALPKAQTTVTCMENGWSPTPRCIRVKTCSSIDIENGFISESQYTY
 ALKEKAKYQCKLGYVTADGETSGSITCGKDGWSAQPTCIKSCDIPVFMNARTKNDFTW
 FKLNDTLDYECHDGYESNTGSTTGSIVCGYNGWSDLPICYERECELPKIDVHLVPDRKK
 DQYKVGVEVLKFSCKPGFTIVGPNSVQCYHFGLSPDLPICKEQVQSCGPPPELLNGNVKEK
 TKEEYGHSEVVEYYCNPRFLMKGPNKIQCVDGEWTTLPVCIVEESTCGDIPELEHGWAQ
 LSSPPYYYGDSVEFNCSESFTMIGHRSITCIHGVWTQLPQCVAIDKLLKCKSSNLIILEEHL
 KKKKEFDHNSNIRYRCRGKEGWIHTVCINGRWDPEVNCSMAQIQLCPPPPQIPNSHNMT
 TTLNYRDGEKVSVLCQENYLIQEGEEITCKDGRWQSIPLCVEKIPCSQPPQIEHGTINSSRS
 SQESYAHGTKLSYTCEGGFRISEENETTCYMGKWSSPPQCEGLPCKSPPEISHGVVAHMS
 DSYQYGEEVTYKCFEGFGIDGPAIAKCLGEKWSHPPSCIKTDCLSLPSFENAIPMGEKKD
 VYKAGEQVTTYTCATYYKMDGASNVTICINSRWTGRPTCRDTSVNPPTVQNAIYVSRQ
 MSKYPSGERVRYQCRSPYEMFGDEEVMCLNGNWTEPPQCKDSTGKCGPPPIDNGDITS
 FPLSVYAPASSVEYQCQONLYQLEGNKRITCRNGQWSEPPKCLHPCVISREIMENYNIALR
 WTAKQKLYSRTGESVEFVCKRGYRLSSRSHTLRITTCWDGKLEYPTCAKR

(SEQ ID NO: 37)

Примером нуклеотидной последовательности, кодирующей фактор комплемента Н, является нуклеотидная последовательность под номером доступа в NCBI NM_000186.

В некоторых вариантах осуществления нуклеотидной последовательностью, кодирующей фактор комплемента Н, является SEQ ID NO: 38.

ATGAGACTTCTAGCAAAGATTATTTGCCTTATGTTATGGGCTATTTGTGTAGC
 AGAAGATTGCAATGAACTTCCTCCAAGAAGAAATACAGAAATTCTGACAGGTTCT
 GGTCTGACCAAACATATCCAGAAGGCACCCAGGCTATCTATAAATGCCGCCCTGGA
 TATAGATCTCTTGGAATGTAATAATGGTATGCAGGAAGGGAGAATGGGTTGCTCTT
 AATCCATTAAGGAAATGTCAGAAAAGGCCCTGTGGACATCCTGGAGATACTCCTTTT
 GGTACTTTTACCCTTACAGGAGGAAATGTGTTTGAATATGGTGTAAAAGCTGTGTAT
 ACATGTAATGAGGGGTATCAATTGCTAGGTGAGATTAATTACCGTGAATGTGACAC
 AGATGGATGGACCAATGATATTCCTATATGTGAAGTTGTGAAGTGTTTACCAGTGAC
 AGCACCAGAGAATGGAAAAATTGTCAGTAGTGCAATGGAACCAGATCGGGAATACC
 ATTTTGGACAAGCAGTACGGTTTGTATGTAACCTCAGGCTACAAGATTGAAGGAGAT
 GAAGAAATGCATTGTTTCAGACGATGGTTTTTGGAGTAAAGAGAAACCAAAGTGTGT
 GGAAATTTTCATGCAAATCCCCAGATGTTATAAATGGATCTCCTATATCTCAGAAGAT
 TATTTATAAGGAGAATGAACGATTTCAATATAAATGTAACATGGGTTATGAATACAG
 TGAAAGAGGAGATGCTGTATGCACTGAATCTGGATGGCGTCCGTTGCCTTCATGTGA
 AGAAAAATCATGTGATAATCCTTATATTCCAAATGGTGACTACTCACCTTTAAGGAT
 TAAACACAGAACTGGAGATGAAATCACGTACCAGTGTAGAAATGGTTTTTATCCTGC
 AACCCGGGGAAATACAGCAAAATGCACAAGTACTGGCTGGATACCTGCTCCGAGAT
 GTACCTTGAAACCTTGTGATTATCCAGACATTAACATGGAGGTCTATATCATGAGA
 ATATGCGTAGACCATACTTTCCAGTAGCTGTAGGAAAATATTACTCCTATTAAGTGTG
 ATGAACATTTTGGAGACTCCGTCAGGAAGTACTGGGATCACATTCATTGCACACAAG
 ATGGATGGTCGCCAGCAGTACCATGCCTCAGAAAATGTTATTTTCCTTATTTGGAAA

ATGGATATAATCAAAATCATGGAAGAAAGTTTGTACAGGGTAAATCTATAGACGTT
GCCTGCCATCCTGGCTACGCTCTTCCAAAAGCGCAGACCACAGTTACATGTATGGAG
AATGGCTGGTCTCCTACTCCCAGATGCATCCGTGTCAAACATGTTCCAAATCAAGT
ATAGATATTGAGAATGGGTTTATTTCTGAATCTCAGTATACATATGCCTTAAAAGAA
AAAGCGAAATATCAATGCAAAGTAGGATATGTAACAGCAGATGGTGAAACATCAGG
ATCAATTACATGTGGGAAAGATGGATGGTCAGCTCAACCCACGTGCATTAAATCTTG
TGATATCCCAGTATTTATGAATGCCAGAACTAAAAATGACTTCACATGGTTTAAAGCT
GAATGACACATTGGACTATGAATGCCATGATGGTTATGAAAGCAATACTGGAAGCA
CCACTGGTTCATAGTGTGTGGTTACAATGGTTGGTCTGATTTACCCATATGTTATGA
AAGAGAATGCGAACTTCCTAAAATAGATGTACACTTAGTTCCTGATCGCAAGAAAG
ACCAGTATAAAGTTGGAGAGGTGTTGAAATTCTCCTGCAAACCAGGATTTACAATA
GTTGGACCTAATTCCGTTCAAGTGTACCACTTTGGATTGTCTCCTGACCTCCCAATAT
GTAAAGAGCAAGTACAATCATGTGGTCCACCTCCTGAACTCCTCAATGGGAATGTTA
AGGAAAAACGAAAGAAGAATATGGACACAGTGAAGTGGTGGAATATTATTGCAA
TCCTAGATTTCTAATGAAGGGACCTAATAAAATTCAATGTGTTGATGGAGAGTGGAC
AACTTTACCAGTGTGTATTGTGGAGGAGAGTACCTGTGGAGATATACCTGAACTTGA
ACATGGCTGGGCCAGCTTTCTTCCCCTCCTTATTACTATGGAGATTCAGTGGAAATC
AATTGCTCAGAATCATTTACAATGATTGGACACAGATCAATTACGTGTATTCATGGA
GTATGGACCCAACCTCCCCAGTGTGTGGCAATAGATAAACTTAAGAAGTGCAAATC
ATCAAATTTAATTATACTTGAGGAACATTTAAAAACAAGAAGGAATTCGATCATA
ATTCTAACATAAGGTACAGATGTAGAGGAAAAGAAGGATGGATACACACAGTCTGC
ATAAATGGAAGATGGGATCCAGAAGTGAAGTCAATGGCACAAATACAATTATG
CCCACCTCCACCTCAGATTTCCAATTCTCACAAATATGACAACCACACTGAATTATCG
GGATGGAGAAAAAGTATCTGTTCTTTGCCAAGAAAATTATCTAATTCAGGAAGGAG
AAGAAATTACATGCAAAGATGGAAGATGGCAGTCAATACCACTCTGTGTTGAAAAA
ATTCCATGTTTACAACCACCTCAGATAGAACACGGAACCATTAATTCATCCAGGTCT
TCACAAGAAAGTTATGCACATGGGACTAAATTGAGTTATACTTGTGAGGGTGGTTTC
AGGATATCTGAAGAAAATGAAACAACATGCTACATGGGAAAATGGAGTTCTCCACC
TCAGTGTGAAGGCCTTCTTGTAAATCTCCACCTGAGATTTCTCATGGTGTGTTAGCT
CACATGTCAGACAGTTATCAGTATGGAGAAGAAGTTACGTACAAATGTTTTGAAGG
TTTTGGAATTGATGGGCCTGCAATTGCAAATGCTTAGGAGAAAAATGGTCTCACCC
TCCATCATGCATAAAAACAGATTGTCTCAGTTTACCTAGCTTTGAAAATGCCATACC
CATGGGAGAGAAGAAGGATGTGTATAAGGCGGGTGAGCAAGTGACTTACACTTGTG
CAACATATTACAAAATGGATGGAGCCAGTAATGTAACATGCATTAATAGCAGATGG
ACAGGAAGGCCAACATGCAGAGACACCTCCTGTGTGAATCCGCCACAGTACAAAA
TGCTTATATAGTGTGCGAGACAGATGAGTAAATATCCATCTGGTGAGAGAGTACGTTA
TCAATGTAGGAGCCCTTATGAAATGTTTGGGGATGAAGAAGTGATGTGTTTAAATGG
AACTGGACGGAACCACCTCAATGCAAAGATTCTACAGGAAAATGTGGGCCCCCTC
CACCTATTGACAATGGGGACATTACTTCATTCCCGTTGTCAGTATATGCTCCAGCTTC
ATCAGTTGAGTACCAATGCCAGAACTTGTATCAACTTGAGGGTAACAAGCGAATAA

CATGTAGAAATGGACAATGGTCAGAACCACCAAATGCTTACATCCGTGTGTAATA
TCCCGAGAAATTATGGAAAATTATAACATAGCATTAAAGGTGGACAGCCAAACAGAA
GCTTTATTCGAGAACAGGTGAATCAGTTGAATTTGTGTGTAACGGGGATATCGTCT
TTCATCACGTTCTCACACATTGCGAACAACATGTTGGGATGGGAAACTGGAGTATCC
AACTTGTGCAAAAAGATAG

(SEQ ID NO: 38)

В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая фактор комплемента Н, обладает по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с SEQ ID NO: 38. Предпочтительно, где белок, кодируемый нуклеотидной последовательностью, по существу сохраняет функциональную активность белка, представленного SEQ ID NO: 37.

В других вариантах осуществления нуклеотидной последовательностью, кодирующей фактор комплемента Н, является SEQ ID NO: 38.

В других вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая фактор комплемента Н, обладает по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с положениями 55-3696 SEQ ID NO: 38. Предпочтительно, где белок, кодируемый нуклеотидной последовательностью, по существу сохраняет функциональную активность белка, представленного SEQ ID NO: 37.

В других вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая фактор комплемента Н, представляет собой положения 55-3696 SEQ ID NO: 38.

В других вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая фактор комплемента Н, кодирует аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с SEQ ID NO: 37. Предпочтительно, где аминокислотная последовательность по существу сохраняет функциональную активность белка, представленного SEQ ID NO: 37.

В других вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая фактор комплемента Н, кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37.

В другом варианте осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая фактор комплемента Н, кодирует аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичностью с положениями 19-1231 SEQ ID NO: 37. Предпочтительно, где аминокислотная последовательность по существу сохраняет функциональную активность белка, представленного SEQ ID NO: 37.

В других вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая фактор комплемента Н, кодирует аминокислотную последовательность положений 19-1231 SEQ ID NO: 37.

Фактор комплемента Н-подобный белок 1 (FHL1)

Фактор комплемента Н-подобный белок 1 (FHL1) представляет собой сплайс-вариант фактора комплемента Н, который содержит первые 7 ССР из фактора комплемента Н, после которых следует карбоксиконцевой хвост из четырех аминокислот (Clark, SJ et al. (2015) J Clin Med 4: 18-31). Было показано, что регуляторная активность FHL1 сопоставима с фактором комплемента Н (Mannes, M., et al., 2020. *Frontiers in Immunology*, 11; 596415).

В некоторых вариантах осуществления полипептид FHL1 или его фрагмент или вариант способны действовать в качестве кофактора для опосредованного фактором комплемента I расщепления C3b. В некоторых вариантах осуществления полипептид FHL1 или его фрагмент или вариант способны повышать скорость диссоциации C3-конвертазы и C5-конвертазы.

В предпочтительных вариантах осуществления полипептид FHL1 или его фрагмент или вариант способны действовать в качестве кофактора для опосредованного фактором комплемента I расщепления C3b и увеличивать скорость диссоциации C3-конвертазы и C5-конвертазы.

Кофакторная активность и активность ускорения диссоциации полипептида FHL1 или его фрагмента или производного можно определять с помощью любого подходящего способа, известного специалисту в данной области. Например, анализом, которые описаны выше для фактора комплемента Н, или любого анализа, описанного в публикации Mannes, M., et al., 2020. *Frontiers in Immunology*, 11; 596415.

В некоторых вариантах осуществления FHL1 представляет собой FHL1 человека.

В некоторых вариантах осуществления аминокислотной последовательностью FHL1 является SEQ ID NO: 39. Предпочтительно вариант или фрагмент по существу сохраняют функциональную активность белка, представленного SEQ ID NO: 39. Предпочтительно фрагмент или вариант FHL1 могут сохранять по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 100% кофакторной активности и/или активности ускорения диссоциации белка, представленного SEQ ID NO: 39.

MRLLAKIICLMLWAICVAEDCNELPPRRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPG
YRSLGNIIMVCRKGEWVALNPLRKCQKRPCGHPGDTPFGTFTLTGGNVFEYGVKAVYT
CNEGYQLLGEINYRECDTDGWTNDIPICEVVKCLPVTAPENGKIVSSAMEPDREYHFGQ
AVRFVCNSGYKIEGDEEMHCSDDGFWFSKEKPKCVEISCKSPDVIINGSPISQKIYKENERF
QYKCNMGYEYSERGDVCTESGWRPLPSCEEKSCDNPIYIPNGDYSPLRIKHRTGDEITY
QCRNGFYPATRGNTAKCTSTGWIPAPRCTLKPCDYPDIKHGGLYHENMRRPYFPVAVG
KYYSYYCDEHFETPSGSYWDHINCTQDGWSPA VPCLRKCYFPYLENGYNQNYGRKFV
QGKSIDVACHPGYALPKAQT TVTCMENGWSPTPRCIRVSFTL

(SEQ ID NO: 39)

Примером нуклеотидной последовательности, кодирующей FHL1, является:

ATGAGACTTCTAGCAAAGATTATTTGCCTTATGTTATGGGCTATTTGTGTAGC
AGAAGATTGCAATGAACTTCCTCCAAGAAGAAATACAGAAATTCTGACAGGTTCTCCT
GGTCTGACCAAACATATCCAGAAGGCACCCAGGCTATCTATAAATGCCGCCCTGGA

TATAGATCTCTTGGAATATAATAATGGTATGCAGGAAGGGAGAATGGGTTGCTCTT
AATCCATTAAGGAAATGTCAGAAAAGGCCCTGTGGACATCCTGGAGATACTCCTTTT
GGTACTTTTACCCTTACAGGAGGAAATGTGTTTGAATATGGTGTAAAAGCTGTGTAT
ACATGTAATGAGGGGTATCAATTGCTAGGTGAGATTAATTACCGTGAATGTGACAC
AGATGGATGGACCAATGATATTCCTATATGTGAAGTTGTGAAGTGTTTACCAGTGAC
AGCACCAGAGAATGGAAAAATTGTCAGTAGTGCAATGGAACCAGATCGGGAATACC
ATTTTGGACAAGCAGTACGGTTTGTATGTAACTCAGGCTACAAGATTGAAGGAGAT
GAAGAAATGCATTGTTTCAGACGATGGTTTTTGGAGTAAAGAGAAACCAAAGTGTGT
GGAAATTTTCATGCAAATCCCCAGATGTTATAAATGGATCTCCTATATCTCAGAAGAT
TATTTATAAGGAGAATGAACGATTTCAATATAAATGTAACATGGGTTATGAATACAG
TGAAAGAGGAGATGCTGTATGCACTGAATCTGGATGGCGTCCGTTGCCTTCATGTGA
AGAAAAATCATGTGATAATCCTTATATTCCAAATGGTGACTACTCACCTTTAAGGAT
TAAACACAGAACTGGAGATGAAATCACGTACCAGTGTAGAAATGGTTTTTATCCTGC
AACCCGGGGAAATACAGCaAAATGCACAAGTACTGGCTGGATACCTGCTCCGAGAT
GTACCTTGAAACCTTGTGATTATCCAGACATTAACATGGAGGTCTATATCATGAGA
ATATGCGTAGACCATACTTTCCAGTAGCTGTAGGAAAATATTACTCCTATTACTGTG
ATGAACATTTTGGAGACTCCGTCAGGAAGTTACTGGGATCACATTCATTGCACACAAG
ATGGATGGTCGCCAGCAGTACCATGCCTCAGAAAATGTTATTTTCCTTATTTGGAAA
ATGGATATAATCAAATTTATGGAAGAAAGTTTGTACAGGGTAAATCTATAGACGTT
GCCTGCCATCCTGGCTACGCTCTTCCAAAAGCGCAGACCACAGTTACATGTATGGAG
AATGGCTGGTCTCCTACTCCCAGATGCATCCGTGTCAGCTTTACCCTCTGA

(SEQ ID NO: 40)

Нуклеотидные последовательности FHL1, применяемые в изобретении, предпочтительно являются кодон-оптимизированными.

Предпочтительной нуклеотидной последовательностью, кодирующей FHL1, является SEQ ID NO: 41.

ATGCGCCTCCTGGCCAAGATCATCTGCCTCATGCTGTGGGCCATCTGCGTGGC
TGAGGACTGCAATGAGCTGCCGCCAGGAGGAACACAGAGATCCTGACAGGGAGCT
GGTCTGACCAGACCTACCCTGAGGGCACCCAGGCGATCTACAAGTGCCGGCCGGGC
TACAGGAGCCTGGGGAACATCATCATGGTGTGTAGAAAGGGCGAATGGGTGGCCCT
CAACCCCTGAGGAAGTGCCAGAAGCGGCCCTGTGGCCACCCGGGGACACACCCT
TCGGGACCTTCACCCTGACCGGCGGCAATGTGTTTGTAGTACGGCGTGAAGGCTGTCT
ACACATGCAACGAGGGGTACCAGCTGCTGGGCGAGATTAACCTACCGGGAGTGTGAC
ACCGATGGGTGGACCAACGACATTCCTATCTGTGAGGTGGTCAAGTGTCTCCCCGTG
ACAGCCCCAGAAAATGGCAAAATCGTGAGCAGCGCCATGGAGCCTGACCGCGAATA
TCACTTTGGGCAGGCCGTGAGGTTTGTGTGCAACTCGGGCTACAAAATTGAAGGTGA
TGAGGAGATGCACTGCAGCGATGATGGCTTCTGGTCCAAGGAGAAGCCCAAATGTG
TGGAGATCTCCTGCAAGTCTCCCGACGTGATCAACGGCAGCCCAATCAGCCAGAAG
ATTATTTACAAAGAGAACGAGCGCTTCCAGTACAAGTGTAAACATGGGCTATGAGTA
TTCAGAGAGGGGAGATGCCGTCTGCACTGAGAGCGGCTGGAGACCACTGCCTAGCT

GCGAGGAAAAGAGTTGTGACAACCCTTACATCCCAAATGGCGACTACTCCCCTCTGC
 GGATCAAACACCGGACCGGGGATGAAATCACCTATCAGTGCCGCAATGGATTCTAC
 CCGGCCACCCGCGGCAACACCGCCAAATGCACCAGCACAGGCTGGATCCCCGCCCC
 CCGCTGTACGCTGAAGCCTTGCGACTATCCAGACATCAAGCACGGAGGCCTGTACC
 ACGAAAACATGCGGCGGCCTTATTTCCCTGTGGCAGTGGGGAAGTACTACAGTACT
 ACTGCGACGAGCACTTCGAGACCCCCTCTGGCTCCTACTGGGACCACATCCACTGCA
 CACAGGACGGCTGGTCTCCAGCTGTGCCCTGCCTGAGGAAATGCTACTTCCCCTACC
 TGGAGAACGGATAACAACCAGAACTATGGCCGCAAGTTCGTGCAGGGCAAGAGCATC
 GATGTGGCCTGCCACCCTGGCTACGCCCTGCCCAAGGCCAGACAACCTGTGACCTGC
 ATGGAGAATGGTTGGAGCCCCACCCCGCGCTGCATCCGGGTGTCCTTCACGCTC

(SEQ ID NO: 41)

В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая FHL1, обладает по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с SEQ ID NO: 40 или 41, предпочтительно SEQ ID NO: 41. Предпочтительно белок, кодируемый нуклеотидной последовательностью, по существу сохраняет функциональную активность белка, представленного SEQ ID NO: 39.

В других вариантах осуществления нуклеотидной последовательностью, кодирующей FHL1, является SEQ ID NO: 40 или 41, предпочтительно SEQ ID NO: 41.

Рецептор комплемента 1 (CR1)

Рецептор комплемента 1 (CR1) опосредует клеточное связывание с частицами и иммунными комплексами, которые активировали комплемент.

В некоторых вариантах осуществления CR1 является человеческим CR1.

В некоторых вариантах осуществления аминокислотной последовательностью CR1 является SEQ ID NO: 42. Предпочтительно вариант или фрагмент по существу сохраняют функциональную активность белка, представленного SEQ ID NO: 42

MGASSPRSPEPVGPPAPGLPFCCGGSLLAVVVLLALPVAWGQCNAPEWLPPFARP
 TNLTDEFEPPIGTYLNYECRPGYSGRPFSSIICLKNSVWTGAKDRRCRRKSCRNPPDPVNGM
 VHVIKGIQFGSQIKYSCTKGYRLIGSSSATCIISGDTVWDNETPICDRIPCGLPPTITNGDFI
 STNRENFHYGSVVITYRCNPGSGGRKVFELVGEPSIYCTSNDDQVGIWSGPAPQCIIPNK
 CTPPNVENGILVSDNRSLSLNEVVEFRCPQGFVMKGP RRVKCQALNKWEPELPSCSRVC
 QPPPDVLHAERTQRDKDNFSPGQEVFYSCEPGYDLRGAASMRCTPQGDWSPAAPTCEV
 KSCDDFMGQLLNGRVLFPVNLQLGAKVDFVCDEGFQLKGSSASYCVLAGMESLWNSS
 VPVCEQIFCSPPPVIPNGRHTGKPLEVFPFGKTVNYTCDPHPDRGTSFDLIGESTIRCTSDP
 QGNGVWSSPAPRCGILGHCQAPDHFLFAKLKTQTNASDFPIGTSCLKYECRPEYYGRPFSI
 TCLDNLVWSSPKDVCKRKSKCTPPDPVNGMVHVITDIQVGSRINYSCTTGHRLIGHSAE
 CILSGNAAHWSTKPPICQRIPCGLPPTIANGDFISTNRENFHYGSVVITYRCNPGSGGRKVF
 ELVGEPSIYCTSNDDQVGIWSGPAPQCIIPNKCTPPNVENGILVSDNRSLSLNEVVEFRCP
 QGFVMKGP RRVKCQALNKWEPELPSCSRVCQPPPDVLHAERTQRDKDNFSPGQEVFYS
 CEPGYDLRGAASMRCTPQGDWSPAAPTCEVKSCDDFMGQLLNGRVLFPVNLQLGAK

VDFVCDEGFQLKGSSASYCVLAGMESLWNSSVPVCEQIFCPSPPVIPNGRHTGKPLEVFP
 FGKAVNYTCDPHPDRGTSFDLIGESTIRCTSDPQNGVWSSPAPRCGILGHCQAPDHFLF
 AKLKTQTNASDFPIGTSLKYECRPEYYGRPFSITCLDNLVWSSPKDVCKRKSCKTPDPV
 NGMVHVITDIQVGSRINYSCTTGHRLLIGHSSAECILSGNTAHWSTKPPICQRIPCGLPPTIA
 NGDFISTNRENHFHYGSVVTYRCNLGSRGRKVFELVGEPSIYCTSNDDQVGIWSGPAPQCI
 IPNKCTPPNVENGILVSDNRSLSLNEVVEFRCQPGFVMKGPRRVKCQALNKWEPELPS
 SRVCQPPPEILHGEHTPSHQDNFSPGQEVFYSCEPGYDLRGAASLHCTPQGDWSPEAPRC
 AVKSCDDFLGQLPHGRVLFPLNLQLGAKVSFVCDEGFRLKGSSVSHCVLVGMRSWNN
 SVPVCEHIFCPNPPAILNGRHTGTPSGDIPYGKEISYTCDFHPDRGMTFNLIGESTIRCTSD
 PHGNGVWSSPAPRCESVRAGHCCTPEQFPFASPTIPINDFEFPVGTSLNYECRPGYFGK
 MFSISCLLENLVWSSVEDNCRKSCGPPPEPFNGMVHINTDTQFGSTVNYSNEGFRLLIGS
 PSTTCLVSGNNVTWDKKAPICEIISCEPPPTISNGDFYSNNRTSFHNGTVVITYQCHTGPDG
 EQLFELVGERSIYCTSKDDQVGVWSSPPRCISTNKCTAPEVENAIRVPGNRSFFSLTEIIR
 FRCQPGFVMVGSHTVQCQTNGRWGPKLPHCSRVCQPPPEILHGEHTLSHQDNFSPGQEV
 FYSCEPSYDLRGAASLHCTPQGDWSPEAPRCTVKSCDDFLGQLPHGRVLLPLNLQLGAK
 VSFVCDEGFRLKGRSASHCVLAGMKALWNSSVPVCEQIFCPNPPAILNGRHTGTPFGDIP
 YGKEISYACDTHPDRGMTFNLIGESSIRCTSDPQNGVWSSPAPRCESVPAACPHPPKIQ
 NGHYYGGHVSLYLPGMTISYICDPGYLLVGKGFIFCTDQGIWSQLDHYCKEVNCSFPLFM
 NGISKELEMKKVYHYGDYVTLKCEDGYTLEGSPWSQCQADDRWDPPLAKCTSRTHDA
 LIVGTLSGTIFFILLIIFLSWILKHRKGNNAHENPKEVAIHLHSQGGSSVHPRTLQTNEENS
 RVLP

(SEQ ID NO: 42)

Мембранный кофакторный белок (MCP)

MCP действует в качестве кофактора для CFI.

В некоторых вариантах осуществления MCP является человеческим MCP.

В некоторых вариантах осуществления аминокислотной последовательностью MCP является SEQ ID NO: 43 или ее вариант или фрагмент. Предпочтительно вариант или фрагмент по существу сохраняют функциональную активность белка, представленного SEQ ID NO: 43

MEPPGRRECPFPSWRFPGLLLAAMVLLLYSFSDACEEPPTFEAMELIGKPKPYEYI
 GERVDYKCKKGYFYIPPLATHITICDRNHTWLPVSDDACYRETCPYIRDPLNGQAVPANG
 TYEFGYQMHFICNEGYYLIGEEILYCELKGSVAIWSGKPPICEKVLCTPPP KIKNGKHTFS
 EVEVFEYLDVAVTYSDDPAPGDPFSLIGESTIYCGDNSVWSRAAPECKVVKCRFPVEN
 GKQISGFGKKFYKATVMFECDKGFYLDGSDTIVCDSNSTWDPPVPKCLKVLPPSSTKP
 PALSHSVSTSSSTTKSPASSASGPRPTYKPPVSNYPGYPKPEEGILDSLVDVAVIVIAIVV
 GVAVICVVPYRYLQRRKKKGTYLTDETHREVKFTSL

(SEQ ID NO: 43)

Линкеры

В предпочтительных вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая молекулу против VEGF, расположена перед нуклеотидной

последовательностью, кодирующей негативный регулятор комплемента. В других вариантах осуществления, нуклеотидная последовательность, кодирующая негативный регулятор комплемента расположена перед нуклеотидной последовательностью, кодирующей молекулу против VEGF.

При использовании в настоящем документе, "перед" и "после" относятся к относительным положениям в ДНК или РНК. Каждая цепь ДНК или РНК имеет 5'-конец и 3'-конец и, в соответствии со сложившейся практикой, "перед" и "после" относятся к направлению 5'→3' соответственно, в котором идет транскрипция РНК. Например, в случае двухцепочечной ДНК, "перед" соответствует расположению в направлении к 5'-концу кодирующей цепи, а "после" соответствует расположению в направлении к 3'-концу кодирующей цепи.

В некоторых вариантах осуществления нуклеотидные последовательности, кодирующие молекулу против VEGF и негативный регулятор комплемента, функционально связаны линкером. В некоторых вариантах осуществления линкер включает саморасщепляющуюся последовательность 2А пептида, такую как последовательность, которая включает или определена последовательностью сайта расщепления фурином, GSG, 11a1D и F2A.

В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой SEQ ID NO: 44.

```
CGAAGGAAACGAGGAAGCGGAGAAGCCAGACACAAACAGAAAATTGTGGC  
ACCGGTGAAACAGACTTTGAATTTTGACCTTCTCAAGTTGGCGGGAGACGTCGAGTC  
CAACCCTGGGCCC
```

(SEQ ID NO: 44)

В других вариантах осуществления линкер обладает по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с SEQ ID NO: 44. Предпочтительно линкер по существу сохраняет функциональную активность SEQ ID NO: 44.

Под "функционально связанным" следует понимать, что отдельные компоненты соединены таким способом, который позволяет им выполнять свою функцию по существу беспрепятственно.

Продукт

Продукт согласно изобретению может, например, быть композицией (например, фармацевтической композицией), включающей: (i) молекулу против VEGF; и (ii) негативный регулятор комплемента, или нуклеотидные последовательности, кодирующие их, в смеси. Также продукт может быть, например, набором, включающим препараты: (i) молекулы против VEGF; и (ii) негативного регулятора комплемента, или нуклеотидных последовательностей, кодирующих их, и, необязательно, инструкции по одновременному, последовательному или разделённому введению таких препаратов нуждающемуся в этом субъекту.

Белковая трансдукция

В качестве альтернативы доставке полинуклеотидов в клетки, продукты и средства

согласно изобретению можно доставлять в клетки путем белковой трансдукции.

Белковую трансдукцию можно осуществлять посредством доставки вектора (Cai, Y. et al. (2014) *Elife* 3: e01911; Maetzig, T. et al. (2012) *Curr. Gene Ther.* 12: 389-409). Доставка вектора включает конструирование вирусных частиц (например, лентивирусных частиц), включающих белки, которые нужно доставить в клетку. Соответственно, когда сконструированные вирусные частицы попадают в клетку в рамках их естественного жизненного цикла, белки, содержащиеся в частицах, переносятся в клетку.

Белковую трансдукцию можно осуществлять посредством доставки белка (Gaj, T. et al. (2012) *Nat. Methods* 9: 805-7). Доставка белка может быть достигнута, например, при использовании носителя (например, липосом) или даже путем введения самого белка непосредственно в клетку.

Полинуклеотид

Полинуклеотиды согласно изобретению могут включать ДНК или РНК, предпочтительно ДНК. Они могут быть одноцепочечными или двухцепочечными. Для специалиста в данной области будет очевидным, что множество различных полинуклеотидов могут кодировать один и тот же полипептид в результате вырожденности генетического кода. Кроме того, следует понимать, что специалисты в данной области техники могут, используя стандартные методики, произвести замены нуклеотидов, которые не повлияют на полипептидную последовательность, кодируемую полинуклеотидами согласно изобретению, чтобы отразить использование кодонов любым конкретным организмом-хозяином, в котором полипептиды согласно изобретению должны экспрессироваться.

Нуклеотидные последовательности согласно изобретению, раскрытые в настоящем документе, могут содержать или не содержать стоп-кодона на своем 3'-конце, например, в зависимости от их положения в бицистронном векторе. Таким образом, настоящее изобретение охватывает номера SEQ ID NO, раскрытые в настоящем документе, в которых стоп-кодона присутствуют или отсутствуют.

Полинуклеотиды могут быть модифицированы любым способом, доступным в уровне техники. Такие модификации могут быть сделаны для повышения активности или увеличения продолжительности существования полинуклеотидов согласно изобретению *in vivo*.

Полинуклеотиды, такие как ДНК полинуклеотиды, могут быть получены рекомбинантно, синтетически или любыми способами, доступными специалистам в данной области. Они также могут быть клонированы с помощью стандартных технологий.

Более протяженные полинуклеотиды обычно получают с применением рекомбинантных средств, например, с применением методов клонирования на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР). Это включает получение пары праймеров (например, длиной приблизительно от 15 до 30 нуклеотидов), фланкирующих последовательность-мишень, которую нужно клонировать, приведение праймеров в контакт с мРНК или кДНК, полученными из клетки животного или человека, проведение

полимеразной цепной реакции при условиях, которые обеспечивают амплификацию требуемой области, выделение амплифицированного фрагмента (например, при очистке реакционной смеси в агарозном геле) и выделение амплифицированной ДНК. Праймеры можно подобрать таким образом, чтобы они содержали подходящие сайты распознавания для эндонуклеаз рестрикции, чтобы амплифицированную ДНК можно было клонировать в подходящий вектор.

Полинуклеотиды могут быть доставлены в клетки с помощью плазмидной трансфекции или электропорации; например, в виде невирусных векторов, таких как голые ДНК-плазмиды, бактериальные искусственные хромосомы, технологии миникольцевых ДНК. Такие молекулы также могут упаковывать трансгены большего размера, чем векторы на основе AAV, но могут иметь небольшой недостаток, заключающийся в их более низкой стабильности, биодоступности и специфичности к мишени. Например, компания Eyeevensys использует платформу электропорации "голой" ДНК для доставки терапевтических трансгенов в мышцы/глаз и т.д.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид включает или состоит из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 45, или нуклеотидной последовательности, обладающей по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с ней.

CGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACSTTTG
 GTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATC
 АСТАGGGGTTCCTGGCGCGCCGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCC
 GCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCCATTTGACGTCAATAATGACGTATGTTCC
 САТАGТААСGССААТАGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTA
 ААСТGСССACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCSTATTGA
 CGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACSTTATGGGA
 STTTCCТАCTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGTATGCGG
 TTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGT
 СТССАСССАТТGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAATCAACGGGACTTT
 ССААААТGTCGТААСААСТССGСССАТТGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACG
 GTGGGAGGTCTАТАТАAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGAC
 GCCATCCACGCTGTTTTGACSTCCАТАGАAGACACCGACTAGTGCCACCATGAAACT
 GCTGCATGTCTTCCCTCCTTCTCCTGTGCTTCCACSTCCGTTTCTGTAAAGTCACSTAC
 АСТАGССAGGAGGATCTGGTGGAGAAGAAATGCCTGGCCAAGAAGTАТАСССАССТ
 GAGCTGCGACAAAGTGTCTGCCAGCCCTGGCAACGCTGCATTGAAGGТАCTTGTGT
 GTGCAAGCTGCCSTACCAGTGCCCCAAGAACGGCACGGCCGTGTGTGCCACCAACA
 GGAGGAGCTTCCCCACCTACTGCCAGCAGAAGAGCCTGGAATGCCTCCACCSTGGC
 ACCAAGTTTCTGAACAACGGGACCTGCACAGCCGAGGGGAAATTCAGCGTCTCCCT
 САAGCACGGCAАТАСАGACTCCGAGGGCATTGTGGAAGTGAAGCTGGTGGACCAGG
 АСАAGACCATGTTCACTCTGCAAAAGCAGCTGGTCCATGCGGGAGGCCAATGTCGCC

TGCCTGGACCTGGGCTTCCAGCAGGGCGCTGATACACAGCGCCGCTTTAAACTCAGT
GACCTCAGCATCAACAGCACTGAGTGTCTGCACGTGCACTGCCGGGGCCTGGAGAC
CAGCCTGGCTGAGTGCACCTTACCAAGCGCAGGACCATGGGCTACCAGGATTTTGC
AGATGTGGTCTGCTACACCCAGAAGGCAGACAGCCCCATGGATGACTTCTTCCAGTG
TGTCAATGGCAAGTACATTTCCAGATGAAGGCTTGTGACGGGATCAATGATTGCGG
GGATCAGAGCGATGAGCTCTGCTGCAAGGCCTGCCAAGGGAAGGGCTTTCAGTGT
AGTCTGGGGTGTGCATCCCTTCTCAGTATCAGTGCAACGGAGAGGTGGACTGCATCA
CTGGGGAGGACGAGGTGGGCTGTGCTGGCTTCGCCTCTGTGGCCCAGGAGGAGACA
GAGATCCTCACAGCTGACATGGATGCAGAGCGGCGGCATCAAGAGTCTGCTCCC
AAAGCTCTCCTGCGGCGTTAAGAATCGCATGCACATCCGGAGGAAGCGGATCGTTG
GAGGCAAACGGGCTCAGCTGGGGGACTTGCCGTGGCAGGTGGCCATCAAAGATGCC
TCCGGAATCACCTGTGGTGGCATCTACATCGGCGGCTGCTGGATCCTGACCGCCGCC
CACTGCCTTCGGGCCAGCAAGACTCACCGCTACCAGATCTGGACCACCGTGGTGGAT
TGGATTCACCCCGACCTGAAGAGGATTGTCATTGAGTATGTCGACCGCATCATCTTC
CATGAAAACATAATGCCGGGACGTATCAGAACGACATCGCCCTCATCGAGATGAA
GAAGGATGGGAACAAGAAGGACTGTGAGCTGCCTCGCTCCATCCCCGCCTGTGTAC
CATGGTCTCCGTACCTGTTCCAGCCAAATGACACATGCATCGTGAGCGGCTGGGGCC
GCGAGAAAGACAACGAGAGGGTCTTCTCCCTGCAGTGGGGTGAAGTCAAGCTGATC
AGCAACTGCTCCAAGTTCTACGGCAACCGCTTCTATGAGAAGGAGATGGAGTGCGC
CGGCACCTATGACGGCAGCATTGACGCGTGCAAGGGAGACAGTGGGGGCCCCCTGG
TCTGCATGGACGCCAACAATGTGACCTACGTGTGGGGAGTTGTGTCCTGGGGCGAG
AACTGTGGCAAGCCTGAGTTCCCGGGCGTGTACACAAAGGTGGCAAACCTATTTTGA
CTGGATCTCCTATCACGTTGGCAGGCCCTTCATTTACAGTACAACGTACGAAGGAA
ACGAGGAAGCGGAGAAGCCAGACACAAACAGAAAATTGTGGCACCGGTGAAACAG
ACTTTGAATTTTGACCTTCTCAAGTTGGCGGGAGACGTGAGTCCAACCCTGGGCCC
ATGCGCCTGCTGGCCAAGATCATCTGCCTGATGCTGTGGGCCATCTGCGTGGCCAGC
GACACCGGCCGCCCTTCGTGGAGATGTACAGCGAGATCCCCGAGATCATCCACAT
GACCGAGGGCCGCGAGCTGGTGTATCCCCTGCCGCGTGACCAGCCCCAACATCACCG
TGACCCTGAAGAAGTTCCCCCTGGACACCCTGATCCCCGACGGCAAGCGCATCATCT
GGGACAGCCGCAAGGGCTTCATCATCAGCAACGCCACCTACAAGGAGATCGGCCTG
CTGACCTGCGAGGCCACCGTGAACGGCCACCTGTACAAGACCAACTACCTGACCCA
CCGCCAGACCAACACCATCATCGACGTGGTGTGAGCCCCAGCCACGGCATCGAGC
TGAGCGTGGGGGAGAAGCTGGTGTGACTGCACCGCCCGCACCGAGCTGAACGTG
GGCATCGACTTCAACTGGGAGTACCCAGCAGCAAGCACCAGCACAAGAAGCTGGT
GAACCGCGACCTGAAGACCCAGAGCGGCAGCGAGATGAAGAAGTTCCTGAGCACCC
TGACCATCGACGGCGTGACCCGCAGCGACCAGGGCCTGTACACCTGCGCCGCCAGC
AGCGGCCTGATGACCAAGAAGAACAGCACCTTCGTGCGCGTGCACGAGAAGGACAA
GACCCACACCTGCCCCCCTGCCCCGCCCCGAGCTGCTGGGCGGCCCCAGCGTGTT
CCTGTTCCCCCACAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGCACCCCCGAGGTGAC
CTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAGGACCCCGAGGTGAAGTTCAACTGGTACG

TGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCCGCGAGGAGCAGTACAA
 CAGCACCTACCGCGTGGTGAGCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACG
 GCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGAGCAACAAGGCCCTGCCCGCCCCCATCGAGAAG
 ACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCC
 CAGCCGCGACGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCT
 TCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAAC
 TACAAGACCACCCCCCGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCAAG
 CTGACCGTGGACAAGAGCCGCTGGCAGCAGGGCAACGTGTTTCAGCTGCAGCGTGAT
 GCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCAGAAGAGCCTGAGCCTGAGCCCCGGCT
 AACTCGAGAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTA
 ACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGC
 TATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTAGTTCTTG
 CCACGGCGGAACTCATCGCCGCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGT
 TGGGCACTGACAATTCCGTGGTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCC
 TCCCCCGTGCTTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTTCCTAATAAA
 ATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGG
 TGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGA
 TGCGGTGGGCTCTATGGGCGGCCGAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCC
 CTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCCGACGCC
 GGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCG

(SEQ ID NO: 45)

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид включает или состоит из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 46 или нуклеотидной последовательности, обладающей по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с ней.

CGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTG
 GTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGCCAACTCCATC
 ACTAGGGGTTCTGGCGCGCCGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCC
 GCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCC
 CATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTA
 AACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGA
 CGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGA
 CTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGTATGCGG
 TTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGA CTACGGGGATTTCCAAGT
 CTCCACCCCATGACGTCAATGGGAGTTTGT TTTGGCACCAAATCAACGGGACTTT
 CCAAATGTCGTAACA ACTCCGCCCATGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACG
 GTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGAC
 GCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGACTAGTGCCACCATGCGCCT
 GCTGGCCAAGATCATCTGCCTGATGCTGTGGGCCATCTGCGTGGCCAGCGACACCGG
 CCGCCCCCTTCGTGGAGATGTACAGCGAGATCCCCGAGATCATCCACATGACCGAGG

GCCGCGAGCTGGTGTATCCCCTGCCGCGTGACCAGCCCCAACATCACCGTGACCCTGA
AGAAGTTCCCCCTGGACACCCTGATCCCCGACGGCAAGCGCATCATCTGGGACAGC
CGCAAGGGCTTCATCATCAGCAACGCCACCTACAAGGAGATCGGCCTGCTGACCTG
CGAGGCCACCCTGAACGGCCACCTGTACAAGACCAACTACCTGACCCACCGCCAGA
CCAACACCATCATCGACGTGGTGTGAGCCCCAGCCACGGCATCGAGCTGAGCGTG
GGCGAGAAGCTGGTGTGAACTGCACCGCCCCGCACCGAGCTGAACGTGGGCATCGA
CTTCAACTGGGAGTACCCAGCAGCAAGCACCAGCACAAGAAGCTGGTGAACCGCG
ACCTGAAGACCCAGAGCGGCAGCGAGATGAAGAAGTTCCTGAGCACCTGACCATC
GACGGCGTGACCCGCAGCGACCAGGGCCTGTACACCTGCGCCGCCAGCAGCGGCCT
GATGACCAAGAAGAAGCAGCACCTTCGTGCGCGTGCACGAGAAGGACAAGACCCAC
ACCTGCCCCCCTGCCCCGCCCCGAGCTGCTGGGCGGCCCCAGCGTGTTCCTGTTC
CCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGCACCCCGAGGTGACCTGCGT
GGTGGTGGACGTGAGCCACGAGGACCCCGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACG
GCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCCGCGAGGAGCAGTACAACAGCAC
CTACCGCGTGGTGTGAGCGTGTGACCGTGTGACCGAGGACTGGTGAACGGCAAGG
AGTACAAGTGCAAGGTGAGCAACAAGGCCCTGCCCCGCCCCATCGAGAAGACCATC
AGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCAGCCG
CGACGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACC
CCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACACTACAA
GACCACCCCCCGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGAC
CGTGGACAAGAGCCGCTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACG
AGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGAGCCCCGGCTAACGA
AGGAAACGAGGAAGCGGAGAAGCCAGACACAAACAGAAAATTGTGGCACCGGTGA
AACAGACTTTGAATTTTGACCTTCTCAAGTTGGCGGGAGACGTTCGAGTCCAACCCTG
GGCCCATGAAACTGCTGCATGTCTTCCTCCTCCTCCTGTGCTTCCACCTCCGTTTCTG
TAAAGTCACCTACACTAGCCAGGAGGATCTGGTGGAGAAGAAATGCCTGGCCAAGA
AGTATACCCACCTGAGCTGCGACAAAGTGTTCCTGCCAGCCCTGGCAACGCTGCATTG
AAGGTACTIONTGTGTGTGCAAGCTGCCCTACCAGTGCCCCAAGAACGGCACGGCCGTG
TGTGCCACCAACAGGAGGAGCTTCCCCACCTACTGCCAGCAGAAGAGCCTGGAATG
CCTCCACCCTGGCACCAAGTTTCTGAACAACGGGACCTGCACAGCCGAGGGGAAAT
TCAGCGTCTCCCTCAAGCACGGCAATACAGACTCCGAGGGCATTGTGGAAGTGAAG
CTGGTGGACCAGGACAAGACCATGTTTCATCTGCAAAAGCAGCTGGTCCATGCGGGA
GGCCAATGTCGCCTGCCTGGACCTGGGCTTCCAGCAGGGCGCTGATACACAGCGCC
GCTTTAAACTCAGTGACCTCAGCATCAACAGCACTGAGTGTCTGCACGTGCACTGCC
GGGGCCTGGAGACCAGCCTGGCTGAGTGCACCTTCACCAAGCGCAGGACCATGGGC
TACCAGGATTTTGCAGATGTGGTCTGCTACACCCAGAAGGCAGACAGCCCCATGGA
TGACTTCTTCAGTGTGTCAATGGCAAGTACATTTCCAGATGAAGGCTTGTGACGG
GATCAATGATTGCGGGGATCAGAGCGATGAGCTCTGCTGCAAGGCCTGCCAAGGGA
AGGGCTTTCAGTGTAAAGTCTGGGGTGTGCATCCCTTCTCAGTATCAGTGCAACGGAG
AGGTGGACTGCATCACTGGGGAGGACGAGGTGGGCTGTGCTGGCTTCGCCTCTGTG

GCCCAGGAGGAGACAGAGATCCTCACAGCTGACATGGATGCAGAGCGGGCGGCAT
 CAAGAGTCTGCTCCCAAAGCTCTCCTGCGGGCGTTAAGAATCGCATGCACATCCGGAG
 GAAGCGGATCGTTGGAGGCCAAACGGGCTCAGCTGGGGGACTTGCCGTGGCAGGTGG
 CCATCAAAGATGCCTCCGGAATCACCTGTGGTGGCATCTACATCGGGCGGCTGCTGGA
 TCCTGACCGCCGCCACTGCCTTCGGGGCCAGCAAGACTCACCGCTACCAGATCTGGA
 CCACCGTGGTGGATTGGATTCACCCCGACCTGAAGAGGATTGTCATTGAGTATGTCTG
 ACCGCATCATCTTCCATGAAAACACTACAATGCCGGGACGTATCAGAACGACATCGCC
 CTCATCGAGATGAAGAAGGATGGGAACAAGAAGGACTGTGAGCTGCCTCGCTCCAT
 CCCCCTGTGTACCATGGTCTCCGTACCTGTTCCAGCCAAATGACACATGCATCGT
 GAGCGGCTGGGGCCGCGAGAAAGACAACGAGAGGGTCTTCTCCCTGCAGTGGGGTG
 AAGTCAAGCTGATCAGCAACTGCTCCAAGTTCTACGGCAACCGCTTCTATGAGAAG
 GAGATGGAGTGCGCCGGCACCTATGACGGCAGCATTGACGCGTGCAAGGGAGACAG
 TGGGGGCCCCCTGGTCTGCATGGACGCCAACAATGTGACCTACGTGTGGGGAGTTGT
 GTCCTGGGGCGAGAACTGTGGCAAGCCTGAGTTCCCGGGCGTGTACACAAAGGTGG
 CAAACTATTTTGACTGGATCTCCTATCACGTTGGCAGGCCCTTCATTTACAGTACA
 ACGTACTCGAGAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTC
 TTA ACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCA
 TGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTTCAATTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTAGTTC
 TTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGC
 TGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGC
 CCTCCCCCGTGCCTTCCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTTCTAAT
 AAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTG
 GGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGG
 GGATGCGGTGGGCTCTATGGGCGGCCGAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCAC
 TCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGGCGACCAAAGGTCGCCCCGACG
 CCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCG

(SEQ ID NO: 46)

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид включает или состоит из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 47 или нуклеотидной последовательности, обладающей по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с ней.

CGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCCGGGCAAAGCCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTG
 GTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGCCAACTCCATC
 ACTAGGGGTTCTTGGCGCGCCGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCC
 GCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCC
 CATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTA
 AACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGA
 CGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGA
 CTTTCTTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGTATGCGG
 TTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTACTCACGGGGATTTCCAAGT

CTCCACCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGT TTTGGCACCAAATCAACGGGACTTT
CCAAAATGTCGTAACA ACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACG
GTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGAC
GCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGACTAGTGCCACCATGAAACT
GCTGCATGTCTTCTCCTCTTCTGTGCTTCCACCTCCGTTTCTGTAAAGTCACCTAC
ACTAGCCAGGAGGATCTGGTGGAGAAGAAATGCCTGGCCAAGAAGTATACCCACCT
GAGCTGCGACAAAGTGTTCTGCCAGCCCTGGCAACGCTGCATTGAAGGTA CTTGTGT
GTGCAAGCTGCCCTACCAGTGCCCCAAGAACGGCACGGCCGTGTGTGCCACCAACA
GGAGGAGCTTCCCCACCTACTGCCAGCAGAAGAGCCTGGAATGCCTCCACCCTGGC
ACCAAGTTTCTGAACAACGGGACCTGCACAGCCGAGGGGAAATTCAGCGTCTCCCT
CAAGCACGGCAATACAGACTCCGAGGGCATTGTGGAAGTGAAGCTGGTGGACCAGG
ACAAGACCATGTTTCATCTGCAAAAGCAGCTGGTCCATGCGGGAGGCCAATGTCGCC
TGCCTGGACCTGGGCTTCCAGCAGGGCGCTGATACACAGCGCCGCTTTAAACTCAGT
GACCTCAGCATCAACAGCACTGAGTGTCTGCACGTGCACTGCCGGGGCCTGGAGAC
CAGCCTGGCTGAGTGCACCTTACCAAGCGCAGGACCATGGGCTACCAGGATTTTGC
AGATGTGGTCTGCTACACCCAGAAGGCAGACAGCCCCATGGATGACTTCTTCCAGTG
TGTC AATGGCAAGTACATTTCCAGATGAAGGCTTGTGACGGGATCAATGATTGCGG
GGATCAGAGCGATGAGCTCTGCTGCAAGGCCTGCCAAGGGAAGGGCTTTC ACTGTA
AGTCTGGGGTGTGCATCCCTTCTCAGTATCAGTGCAACGGAGAGGTGGACTGCATCA
CTGGGGAGGACGAGGTGGGCTGTGCTGGCTTCGCCTCTGTGGCCAGGAGGAGACA
GAGATCCTCACAGCTGACATGGATGCAGAGCGGCGGCATCAAGAGTCTGCTCCC
AAAGCTCTCCTGCGGCGTTAAGAATCGCATGCACATCCGGAGGAAGCGGATCGTTG
GAGGCAAACGGGCTCAGCTGGGGGACTTGCCGTGGCAGGTGGCCATCAAAGATGCC
TCCGGAATCACCTGTGGTGGCATCTACATCGGCGGCTGCTGGATCCTGACCGCCGCC
CACTGCCTTCGGGCCAGCAAGACTCACCGCTACCAGATCTGGACCACCGTGGTGGAT
TGGATTCACCCCGACCTGAAGAGGATTGTCATTGAGTATGTCGACCGCATCATCTTC
CATGAAA ACTACAATGCCGGGACGTATCAGAACGACATCGCCCTCATCGAGATGAA
GAAGGATGGGAACAAGAAGGACTGTGAGCTGCCTCGCTCCATCCCCGCCTGTGTAC
CATGGTCTCCGTACCTGTTCCAGCCAAATGACACATGCATCGTGAGCGGCTGGGGCC
GCGAGAAAGACAACGAGAGGGTCTTCTCCCTGCAGTGGGGTGAAGTCAAGCTGATC
AGCAACTGCTCCAAGTTCTACGGCAACCGCTTCTATGAGAAGGAGATGGAGTGCGC
CGGCACCTATGACGGCAGCATTGACGCGTGCAAGGGAGACAGTGGGGGCCCCCTGG
TCTGCATGGACGCCAACAATGTGACCTACGTGTGGGGAGTTGTGTCTCTGGGGCGAG
AACTGTGGCAAGCCTGAGTTCCCGGGCGTGTACACAAAGGTGGCAA ACTATTTTGA
CTGGATCTCCTATCACGTTGGCAGGCCCTTCATTTACAGTACAACGTACGAAGGAA
ACGAGGAAGCGGAGAAGCCAGACACAAACAGAAAATTGTGGCACCGGTGAAACAG
ACTTTGAATTTTGACCTTCTCAAGTTGGCGGGAGACGTCGAGTCCAACCCTGGGCCC
ATGCGCCTGCTGGCCAAGATCATCTGCCTGATGCTGTGGGCCATCTGCGTGGCCAGC
GACACCGGCCGCCCTTCGTGGAGATGTACAGCGAGATCCCCGAGATCATCCACAT
GACCGAGGGCCGCGAGCTGGTGATCCCCTGCCGCGTGACCAGCCCCAACATCACCG

TGACCCTGAAGAAGTTCCCCCTGGACACCCTGATCCCCGACGGCAAGCGCATCATCT
 GGGACAGCCGCAAGGGCTTCATCATCAGCAACGCCACCTACAAGGAGATCGGCCTG
 CTGACCTGCGAGGCCACCGTGAACGGCCACCTGTACAAGACCAACTACCTGACCCA
 CCGCCAGACCAACACCATCATCGACGTGGTGCTGAGCCCCAGCCACGGCATCGAGC
 TGAGCGTGGGCGAGAAGCTGGTGCTGAACTGCACCGCCCCGACCGAGCTGAACGTG
 GGCATCGACTTCAACTGGGAGTACCCCAGCAGCAAGCACCAGCACAAGAAGCTGGT
 GAACCGCGACCTGAAGACCCAGAGCGGCAGCGAGATGAAGAAGTTCCTGAGCACCC
 TGACCATCGACGGCGTGACCCGCAGCGACCAGGGCCTGTACACCTGCGCCGCCAGC
 AGCGGCCTGATGACCAAGAAGAACAGCACCTTCGTGCGCGTGCACGAGAAGGACAA
 GACCCACACCTGCCCCCCTGCCCCGCCCCGAGCTGCTGGGCGGCCCCAGCGTGTT
 CCTGTTCCCCCACAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGCACCCCCGAGGTGAC
 CTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAGGACCCCGAGGTGAAGTTCAACTGGTACG
 TGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCCGCGAGGAGCAGTACAA
 CAGCACCTACCGCGTGGTGAGCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACG
 GCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGAGCAACAAGGCCCTGCCCGCCCCCATCGAGAAG
 ACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCC
 CAGCCGCGACGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCT
 TCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAAC
 TACAAGACCACCCCCCGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCAAG
 CTGACCGTGGACAAGAGCCGCTGGCAGCAGGGCAACGTGTTTCAGCTGCAGCGTGAT
 GCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCAGAAGAGCCTGAGCCTGAGCCCCGGCT
 AACTCGAGGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCGTGCCTTC
 CTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTTCTAATAAAATGAGGAAATTGC
 ATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAG
 CAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCT
 ATGGGCGGCCGCAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTC
 GCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGG
 GCGGCCTCAGTGAGCGAGCG

(SEQ ID NO: 47)

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид включает или состоит из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 48 или нуклеотидной последовательности, обладающей по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с ней.

CGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTG
 GTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGCCAACTCCATC
 ACTAGGGGTTCTGGCGCGCCGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCC
 GCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCC
 CATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTA
 AACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGA
 CGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGA

CTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGG
TTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGT
CTCCACCCCATTTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAATCAACGGGACTTT
CCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACG
GTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTGTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGAC
GCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGACTAGTGCCACCATGCGCCT
GCTGGCCAAGATCATCTGCCTGATGCTGTGGGCCATCTGCGTGGCCAGCGACACCGG
CCGCCCCTTCGTGGAGATGTACAGCGAGATCCCCGAGATCATCCACATGACCGAGG
GCCGCGAGCTGGTGATCCCCTGCCGCGTGACCAGCCCCAACATCACCGTGACCCTGA
AGAAGTTCCCCCTGGACACCCTGATCCCCGACGGCAAGCGCATCATCTGGGACAGC
CGCAAGGGCTTCATCATCAGCAACGCCACCTACAAGGAGATCGGCCTGCTGACCTG
CGAGGCCACCGTGAACGGCCACCTGTACAAGACCAACTACCTGACCCACCGCCAGA
CCAACACCATCATCGACGTGGTGCTGAGCCCCAGCCACGGCATCGAGCTGAGCGTG
GGCGAGAAGCTGGTGCTGAACTGCACCGCCCCGCACCGAGCTGAACGTGGGCATCGA
CTTCAACTGGGAGTACCCAGCAGCAAGCACCAGCACAAGAAGCTGGTGAACCGCG
ACCTGAAGACCCAGAGCGGCAGCGAGATGAAGAAGTTCCTGAGCACCTGACCATC
GACGGCGTGACCCGCAGCGACCAGGGCCTGTACACCTGCGCCGCCAGCAGCGGCCT
GATGACCAAGAAGAAGCAGCACCTTCGTGCGCGTGCACGAGAAGGACAAGACCCAC
ACCTGCCCCCCTGCCCCGCCCCGAGCTGCTGGGCGGCCCCAGCGTGTTCCTGTTC
CCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGCACCCCGAGGTGACCTGCGT
GGTGGTGGACGTGAGCCACGAGGACCCCGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACG
GCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCCGCGAGGAGCAGTACAACAGCAC
CTACCGCGTGGTGAGCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGG
AGTACAAGTGCAAGGTGAGCAACAAGGCCCTGCCCCCCCCATCGAGAAGACCATC
AGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCAGCCG
CGACGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACC
CCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACACTACAA
GACCACCCCCCGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGAC
CGTGGACAAGAGCCGCTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACG
AGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGAGCCCCGGCTAACGA
AGGAAACGAGGAAGCGGAGAAGCCAGACACAAACAGAAAATTGTGGCACCGGTGA
AACAGACTTTGAATTTTGTACCTTCTCAAGTTGGCGGGAGACGTTCGAGTCCAACCCTG
GGCCCATGAAACTGCTGCATGTCTTCCTCCTCCTCCTGTGCTTCCACCTCCGTTTCTG
TAAAGTCACCTACACTAGCCAGGAGGATCTGGTGGAGAAGAAATGCCTGGCCAAGA
AGTATACCCACCTGAGCTGCGACAAAGTGTTCTGCCAGCCCTGGCAACGCTGCATTG
AAGGTACTTGTGTGTGCAAGCTGCCCTACCAGTGCCCCAAGAACGGCACGGCCGTG
TGTGCCACCAACAGGAGGAGCTTCCCCACCTACTGCCAGCAGAAGAGCCTGGAATG
CCTCCACCCTGGCACCAAGTTTCTGAACAACGGGACCTGCACAGCCGAGGGGAAAT
TCAGCGTCTCCCTCAAGCACGGCAATACAGACTCCGAGGGCATTGTGGAAGTGAAG
CTGGTGGACCAGGACAAGACCATGTTTCATCTGCAAAAGCAGCTGGTCCATGCGGGA

GGCCAATGTCGCCTGCCTGGACCTGGGCTTCCAGCAGGGCGCTGATACACAGCGCC
GCTTTAAACTCAGTGACCTCAGCATCAACAGCACTGAGTGTCTGCACGTGCACTGCC
GGGGCCTGGAGACCAGCCTGGCTGAGTGCACCTTCACCAAGCGCAGGACCATGGGC
TACCAGGATTTTGCAGATGTGGTCTGCTACACCCAGAAGGCAGACAGCCCCATGGA
TGACTTCTTCCAGTGTGTCAATGGCAAGTACATTTCCAGATGAAGGCTTGTGACGG
GATCAATGATTGCGGGGATCAGAGCGATGAGCTCTGCTGCAAGGCCTGCCAAGGGA
AGGGCTTTCAGTGTAAAGTCTGGGGTGTGCATCCCTTCTCAGTATCAGTGCAACGGAG
AGGTGGACTGCATCACTGGGGAGGACGAGGTGGGCTGTGCTGGCTTCGCCTCTGTG
GCCCAGGAGGAGACAGAGATCCTCACAGCTGACATGGATGCAGAGCGGCGGCAT
CAAGAGTCTGCTCCCAAAGCTCTCCTGCGGCGTTAAGAATCGCATGCACATCCGGAG
GAAGCGGATCGTTGGAGGCCAACGGGCTCAGCTGGGGGACTTGCCGTGGCAGGTGG
CCATCAAAGATGCCTCCGGAATCACCTGTGGTGGCATCTACATCGGCGGCTGCTGGA
TCCTGACCGCCGCCACTGCCTTCGGGCCAGCAAGACTCACCGCTACCAGATCTGGA
CCACCGTGGTGGATTGGATTCACCCCGACCTGAAGAGGATTGTCATTGAGTATGTGCG
ACCGCATCATCTTCCATGAAAACACTACAATGCCGGGACGTATCAGAACGACATCGCC
CTCATCGAGATGAAGAAGGATGGGAACAAGAAGGACTGTGAGCTGCCTCGCTCCAT
CCCCGCCTGTGTACCATGGTCTCCGTACCTGTTCCAGCCAAATGACACATGCATCGT
GAGCGGCTGGGGCCGCGAGAAAGACAACGAGAGGGTCTTCTCCTGCAGTGGGGTG
AAGTCAAGCTGATCAGCAACTGCTCCAAGTTCTACGGCAACCGCTTCTATGAGAAG
GAGATGGAGTGCGCCGGCACCTATGACGGCAGCATTGACGCGTGCAAGGGAGACAG
TGGGGGCCCCCTGGTCTGCATGGACGCCAACAATGTGACCTACGTGTGGGGAGTTGT
GTCCTGGGGCGAGAACTGTGGCAAGCCTGAGTTCCTGGGCGTGTACACAAAGGTGG
CAAACATTTTACTGGATCTCCTATCACGTTGGCAGGCCCTTCATTTACAGTACA
ACGTAICTCGAGGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCTCCCCCGTGCC
TTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAAT
TGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGA
CAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGC
TCTATGGGCGGCCGAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCG
CTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTGCGCCGACGCCGGGCTTTGCC
GGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCG (SEQ ID NO: 48)

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид включает или состоит из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 49 или нуклеотидной последовательности, обладающей по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с ней.

CGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTGGGGCGACCTTTG
GTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATC
ACTAGGGGTTCTGGCGCGCCGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCC
GCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCC
CATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTA
AACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGA

CGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGA
CTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGG
TTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGT
CTCCACCCCATGACGTCAATGGGAGTTTGT TTTGGCACCAAATCAACGGGACTTT
CCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCATGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACG
GTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGAC
GCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGACTAGTGCCACCATGCGCCT
CCTGGCCAAGATCATCTGCCTCATGCTGTGGGCCATCTGCGTGGCTGAGGACTGCAA
TGAGCTGCCGCCAGGAGGAACACAGAGATCCTGACAGGGAGCTGGTCTGACCAGA
CCTACCCTGAGGGCACCCAGGCGATCTACAAGTGCCGGCCGGGCTACAGGAGCCTG
GGGAACATCATCATGGTGTGTAGAAAGGGCGAATGGGTGGCCCTCAACCCCTGAG
GAAGTGCCAGAAGCGGCCCTGTGGCCACCCCGGGGACACACCCTTCGGGACCTTCA
CCCTGACCGGCGGCAATGTGTTTGTAGTACGGCGTGAAGGCTGTCTACACATGCAAC
GAGGGGTACCAGCTGCTGGGCGAGATTA ACTACCGGGAGTGTGACACCGATGGGTG
GACCAACGACATTCCCATCTGTGAGGTGGTCAAGTGTCTCCCCGTGACAGCCCCAGA
AAATGGCAAATCGTGAGCAGCGCCATGGAGCCTGACCGCGAATATCACTTTGGGC
AGGCCGTGAGGTTTGTGTGCAACTCGGGCTACAAAATTGAAGGTGATGAGGAGATG
CACTGCAGCGATGATGGCTTCTGGTCCAAGGAGAAGCCCAAATGTGTGGAGATCTC
CTGCAAGTCTCCCGACGTGATCAACGGCAGCCCAATCAGCCAGAAGATTATTTACA
AAGAGAACGAGCGCTTCCAGTACAAGTGTAACATGGGCTATGAGTATTCAGAGAGG
GGAGATGCCGTCTGCACTGAGAGCGGCTGGAGACCACTGCCTAGCTGCGAGGAAAA
GAGTTGTGACAACCCTTACATCCCAAATGGCGACTACTCCCCTCTGCGGATCAAACA
CCGGACCGGGGATGAAATCACCTATCAGTGCCGCAATGGATTCTACCCGGCCACCC
GCGGCAACACCGCCAAATGCACCAGCACAGGCTGGATCCCCGCCCCCGCTGTACG
CTGAAGCCTTGC GACTATCCAGACATCAAGCACGGAGGCCTGTACCACGAAAACAT
GCGGCGGCCTTATTTCCCTGTGGCAGTGGGGAAGTACTACAGCTACTACTGCGACGA
GCACTTCGAGACCCCTCTGGCTCCTACTGGGACCACATCCACTGCACACAGGACGG
CTGGTCTCCAGCTGTGCCCTGCCTGAGGAAATGCTACTTCCCCTACCTGGAGAACGG
ATACAACCAGA ACTATGGCCGCAAGTTCGTGCAGGGCAAGAGCATCGATGTGGCCT
GCCACCCTGGCTACGCCCTGCCCAAGGCCAGACA ACTGTGACCTGCATGGAGAAT
GGTTGGAGCCCCACCCCGCGCTGCATCCGGGTGTCCTTCACGCTCCGAAGGAAACG
AGGAAGCGGAGAAGCCAGACACAAACAGAAAATTGTGGCACCGGTGAAACAGACT
TTGAATTTTGACCTTCTCAAGTTGGCGGGAGACGTCGAGTCCAACCCTGGGCCCATG
CGCCTGCTGGCCAAGATCATCTGCCTGATGCTGTGGGCCATCTGCGTGGCCAGCGAC
ACCGGCCGCCCTTCGTGGAGATGTACAGCGAGATCCCCGAGATCATCCACATGAC
CGAGGGCCGCGAGCTGGTGTATCCCCTGCCGCGTGACCAGCCCCAACATCACCGTGA
CCCTGAAGAAGTTCCCCTGGACACCCTGATCCCCGACGGCAAGCGCATCATCTGGG
ACAGCCGCAAGGGCTTCATCATCAGCAACGCCACCTACAAGGAGATCGGCCTGCTG
ACCTGCGAGGCCACCGTGAACGGCCACCTGTACAAGACCAACTACCTGACCCACCG
CCAGACCAACACCATCATCGACGTGGTGTGAGCCCCAGCCACGGCATCGAGCTGA

GCGTGGGCGAGAAGCTGGTGCTGAACTGCACCGCCCGCACCGAGCTGAACGTGGGC
ATCGACTTCAACTGGGAGTACCCAGCAGCAAGCACCAGCACAAGAAGCTGGTGAA
CCGCGACCTGAAGACCCAGAGCGGCAGCGAGATGAAGAAGTTCCTGAGCACCCCTGA
CCATCGACGGCGTGACCCGCAGCGACCAGGGCCTGTACACCTGCGCCGCCAGCAGC
GGCCTGATGACCAAGAAGAACAGCACCTTCGTGCGCGTGCACGAGAAGGACAAGAC
CCACACCTGCCCCCCTGCCCCGCCCCGAGCTGCTGGGCGGCCCCAGCGTGTTCTT
GTTCCCCCAAGCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGCACCCCGAGGTTGACCT
GCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAGGACCCCGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTG
GACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCCGCGAGGAGCAGTACAACA
GCACCTACCGCGTGGTGAAGCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGC
AAGGAGTACAAGTGCAAGGTGAGCAACAAGGCCCTGCCCCCCCCATCGAGAAGAC
CATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCA
GCCGCGACGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTC
TACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAATA
CAAGACCACCCCCCGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCTGTACAGCAAGCT
GACCGTGGACAAGAGCCGCTGGCAGCAGGGCAACGTGTTTACGCTGCAGCGTGATGC
ACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGAGCCCCGGCTAA
CTCGAGAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAAC
TATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTA
TTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTT
TATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGT
GACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTCCGGGACT
TTCGCTTTCCTCCTATTGCCACGGCGGAACATCGCCGCTGCCTTGCCCGCT
GCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCGTTGGTGTGTCGGGGAAA
TCATCGTCCTTTCCTTGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGT
CCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCTTCCCGCGGCCTGCT
GCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCC
CTTTGGGCCGCCTCCCCGCATCGATACCGTCGACTCGCTGATCAGCCTGTGCCTTCTA
GTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGC
CACTCCCACTGTCTTTCCTAATAAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAG
GTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGG
AAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGGCGGCCGCAGGAAC
CCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCG
GGCGACCAAAGGTCGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAG
CG

(SEQ ID NO: 49)

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид включает или состоит из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 50 или нуклеотидной последовательности, обладающей по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с ней.

CGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTG
GTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATC
ACTAGGGGTTCTGCGCGCCGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCC
GCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCC
CATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTA
AACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGA
CGTCAATGACGGTAAATGGCCCCGCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGA
CTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGG
TTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGT
CTCCACCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTGTTTTGGCACCAAATCAACGGGACTTT
CCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACG
GTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGAC
GCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGACTAGTGCCACCATGCGCCT
GCTGGCCAAGATCATCTGCCTGATGCTGTGGGCCATCTGCGTGGCCAGCGACACCGG
CCGCCCTTCGTGGAGATGTACAGCGAGATCCCCGAGATCATCCACATGACCGAGG
GCCGCGAGCTGGTGATCCCCTGCCGCGTGACCAGCCCCAACATCACCGTGACCCTGA
AGAAGTTCCTGGACACCCTGATCCCCGACGGCAAGCGCATCATCTGGGACAGC
CGCAAGGGCTTCATCATCAGCAACGCCACCTACAAGGAGATCGGCCTGCTGACCTG
CGAGGCCACCGTGAACGGCCACCTGTACAAGACCAACTACCTGACCCACCGCCAGA
CCAACACCATCATCGACGTGGTGCTGAGCCCCAGCCACGGCATCGAGCTGAGCGTG
GGCGAGAAGCTGGTGCTGAACTGCACCGCCCGCACCGAGCTGAACGTGGGCATCGA
CTTCAACTGGGAGTACCCAGCAGCAAGCACCAGCACAAGAAGCTGGTGAACCGCG
ACCTGAAGACCCAGAGCGGCAGCGAGATGAAGAAGTTCCTGAGCACCTGACCATC
GACGGCGTGACCCGCGAGCGACCAGGGCCTGTACACCTGCGCCGCCAGCAGCGGCCT
GATGACCAAGAAGAAGCAGCACCTTCGTGCGCGTGCACGAGAAGGACAAGACCCAC
ACCTGCCCCCTGCCCCGCCCCGAGCTGCTGGGCGGCCCCAGCGTGTTCTGTTC
CCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGCACCCCCGAGGTGACCTGCGT
GGTGGTGGACGTGAGCCACGAGGACCCCGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACG
GCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCCGCGAGGAGCAGTACAACAGCAC
CTACCGCGTGGTGAGCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGG
AGTACAAGTGCAAGGTGAGCAACAAGGCCCTGCCCGCCCCATCGAGAAGACCATC
AGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCAGCCG
CGACGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACC
CCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACACTACAA
GACCACCCCCCGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGAC
CGTGGACAAGAGCCGCTGGCAGCAGGGCAACGTGTTTACGCTGCAGCGTGATGCACG
AGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGAGCCCCGGCTAACGA
AGGAAACGAGGAAGCGGAGAAGCCAGACACAAACAGAAAATTGTGGCACCGGTGA
AACAGACTTTGAATTTTGACCTTCTCAAGTTGGCGGGAGACGTGAGTCCAACCCTG
GGCCCATGCGCCTCCTGGCCAAGATCATCTGCCTCATGCTGTGGGCCATCTGCGTGG

CTGAGGACTGCAATGAGCTGCCGCCAGGAGGAACACAGAGATCCTGACAGGGAGC
TGGTCTGACCAGACCTACCCTGAGGGCACCCAGGCGATCTACAAGTGCCGGCCGGG
CTACAGGAGCCTGGGGAACATCATCATGGTGTGTAGAAAGGGCGAATGGGTGGCC
TCAACCCCCTGAGGAAGTGCCAGAAGCGGCCCTGTGGCCACCCCGGGGACACACCC
TTCGGGACCTTCACCCTGACCGGCGGCAATGTGTTTGTAGTACGGCGTGAAGGCTGTC
TACACATGCAACGAGGGGTACCAGCTGCTGGGCGAGATTA ACTACCGGGAGTGTGA
CACCGATGGGTGGACCAACGACATTCCCATCTGTGAGGTGGTCAAGTGTCTCCCCGT
GACAGCCCCAGAAAATGGCAAATCGTGAGCAGCGCCATGGAGCCTGACCGCGAAT
ATCACTTTGGGCAGGCCGTGAGGTTTGTGTGCAACTCGGGCTACAAAATTGAAGGTG
ATGAGGAGATGCACTGCAGCGATGATGGCTTCTGGTCCAAGGAGAAGCCCAAATGT
GTGGAGATCTCCTGCAAGTCTCCCGACGTGATCAACGGCAGCCCAATCAGCCAGAA
GATTATTTACAAAGAGAACGAGCGCTTCCAGTACAAGTGTAACATGGGCTATGAGT
ATTCAGAGAGGGGAGATGCCGTCTGCACTGAGAGCGGCTGGAGACCACTGCCTAGC
TGCGAGGAAAAGAGTTGTGACAACCCTTACATCCCAAATGGCGACTACTCCCCTCTG
CGGATCAAACACCGGACCGGGGATGAAATCACCTATCAGTGCCGCAATGGATTCTA
CCCGGCCACCCGCGGCAACACCGCCAAATGCACCAGCACAGGCTGGATCCCCGCC
CCCGCTGTACGCTGAAGCCTTGGGACTATCCAGACATCAAGCACGGAGGCCTGTACC
ACGAAAACATGCGGCGGCCTTATTTCCCTGTGGCAGTGGGGAAGTACTACAGCTACT
ACTGCGACGAGCACTTCGAGACCCCCTCTGGCTCCTACTGGGACCACATCCACTGCA
CACAGGACGGCTGGTCTCCAGCTGTGCCCTGCCTGAGGAAATGCTACTTCCCCTACC
TGGAGAACGGATAACAACCAGAACTATGGCCGCAAGTTCGTGCAGGGCAAGAGCATC
GATGTGGCCTGCCACCCTGGCTACGCCCTGCCAAGGCCAGACA ACTGTGACCTGC
ATGGAGAATGGTTGGAGCCCCACCCCGCGCTGCATCCGGGTGTCCTTCACGCTCCTC
GAGAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTAT
GTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTG
CTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTTTAT
GAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGTGAC
GCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCGGGACTTTC
GCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCCGCTGCT
GGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGTGTCGGGGAAATCA
TCGTCTTTCCTTGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCCT
TCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCTTCCCGCGGCCTGCTGCC
GGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTT
TGGGCCGCCTCCCCGCATCGATACCGTCGACTCGCTGATCAGCCTGTGCCTTCTAGT
TGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCCGTGCCTTCCCTTGACCCTGGAAGGTGCCA
CTCCCCTGTCTTTCCTAATAAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGT
GTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGGAGGATTGGGAA
GACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGGCGGCCGCAGGAACCC
CTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGG
CGACCAAAGGTCGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCG

(SEQ ID NO: 50)

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид включает или состоит из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 51 или нуклеотидной последовательности, обладающей по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с ней.

CGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGGCGACCTTTG
GTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATC
ACTAGGGGTTCTTGGCGCGCCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTA
ACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCC
CACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAAT
GACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTT
ACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTCGAGGTGAGCCCC
ACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTTTGTATTTATT
TATTTTTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGC
CAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGG
CGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGG
CGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGGCGGGGAGTCGCTGCGCGCTG
CCTTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCGCCGCCTCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACT
GACCGCGTTACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAA
TTAGCGCTTGGTTTAATGACGGCTTGTTCCTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTGAG
GGGCTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGAGCGGCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGG
ACGGCTGCCTTCGGGGGGGACGGGGCAGGGCGGGGTTTCGGCTTCTGGCGTGTGACC
GGCGGCTCTAGAGCCTCTGCTAACCATGTTTCATGCCTTCTTCTTTTCTACAGCTCC
TGGGCAACGTGCTGGTTATTGTGCTGTCTCATCATTTTGGCAAAGAATTGGATCCAC
TAGTGCCACCATGCGCCTCCTGGCCAAGATCATCTGCCTCATGCTGTGGGCCATCTG
CGTGGCTGAGGACTGCAATGAGCTGCCGCCAGGAGGAACACAGAGATCCTGACAG
GGAGCTGGTCTGACCAGACCTACCCTGAGGGCACCCAGGCGATCTACAAGTGCCGG
CCGGGCTACAGGAGCCTGGGGAACATCATCATGGTGTGTAGAAAGGGCGAATGGGT
GGCCCTCAACCCCTGAGGAAGTGCCAGAAGCGGCCCTGTGGCCACCCCGGGGACA
CACCCCTTCGGGACCTTACCCTGACCGGCGGCAATGTGTTTGTAGTACGGCGTGAAGG
CTGTCTACACATGCAACGAGGGGTACCAGCTGCTGGGCGAGATTAACCTACCGGGAG
TGTGACACCGATGGGTGGACCAACGACATTCCCATCTGTGAGGTGGTCAAGTGTCTC
CCCGTGACAGCCCCAGAAAATGGCAAAATCGTGAGCAGCGCCATGGAGCCTGACCG
CGAATATCACTTTGGGCAGGCCGTGAGGTTTGTGTGCAACTCGGGCTACAAAATTGA
AGGTGATGAGGAGATGCACTGCAGCGATGATGGCTTCTGGTCCAAGGAGAAGCCCA
AATGTGTGGAGATCTCCTGCAAGTCTCCCGACGTGATCAACGGCAGCCCAATCAGCC
AGAAGATTATTTACAAAGAGAACGAGCGCTTCCAGTACAAGTGTAACATGGGCTAT
GAGTATTCAGAGAGGGGAGATGCCGTCTGCACTGAGAGCGGCTGGAGACCACTGCC
TAGCTGCGAGGAAAAGAGTTGTGACAACCCTTACATCCCAAATGGCGACTACTCCC
CTCTGCGGATCAAACACCGGACCGGGGATGAAATCACCTATCAGTGCCGCAATGGA

TTCTACCCGGCCACCCGCGGCAACACCCGCCAAATGCACCAGCACAGGCTGGATCCC
CGCCCCCGCTGTACGCTGAAGCCTTGCGACTATCCAGACATCAAGCACGGAGGCCT
GTACCACGAAAACATGCGGCGGCCTTATTTCCCTGTGGCAGTGGGGAAGTACTACA
GCTACTACTGCGACGAGCACTTCGAGACCCCCCTCTGGCTCCTACTGGGACCACATCC
ACTGCACACAGGACGGCTGGTCTCCAGCTGTGCCCTGCCTGAGGAAATGCTACTTCC
CCTACCTGGAGAACGGATAACAACCAGA ACTATGGCCGCAAGTTCGTGCAGGGCAAG
AGCATCGATGTGGCCTGCCACCCTGGCTACGCCCTGCCCAAGGCCAGACA ACTGTG
ACCTGCATGGAGAATGGTTGGAGCCCCACCCGCGCTGCATCCGGGTGTCCTTCACG
CTCCGAAGGAAACGAGGAAGCGGAGAAGCCAGACACAAACAGAAAATTGTGGCAC
CGGTGAAACAGACTTTGAATTTTGACCTTCTCAAGTTGGCGGGAGACGTTCGAGTCCA
ACCCTGGGCCCATGCGCCTGCTGGCCAAGATCATCTGCCTGATGCTGTGGGCCATCT
GCGTGGCCAGCGACACCGGCCGCCCTTCGTGGAGATGTACAGCGAGATCCCCGAG
ATCATCCACATGACCGAGGGCCGCGAGCTGGTGTATCCCCTGCCGCGTGACCAGCCC
CAACATCACCGTGACCCTGAAGAAGTTCCCCCTGGACACCCTGATCCCCGACGGCA
AGCGCATCATCTGGGACAGCCGCAAGGGCTTCATCATCAGCAACGCCACCTACAAG
GAGATCGGCCTGCTGACCTGCGAGGCCACCGTGAACGGCCACCTGTACAAGACCAA
CTACCTGACCCACCGCCAGACCAACACCATCATCGACGTGGTGTGAGCCCCAGCC
ACGGCATCGAGCTGAGCGTGGGCGAGAAGCTGGTGTGAACTGCACCGCCCCGCACC
GAGCTGAACGTGGGCATCGACTTCAACTGGGAGTACCCAGCAGCAAGCACCAGCA
CAAGAAGCTGGTGAACCGCGACCTGAAGACCCAGAGCGGCAGCGAGATGAAGAAG
TTCCTGAGCACCTGACCATCGACGGCGTGACCCGCAGCGACCAGGGCCTGTACAC
CTGCGCCGCCAGCAGCGGCCTGATGACCAAGAAGAACAGCACCTTCGTGCGCGTGC
ACGAGAAGGACAAGACCCACACCTGCCCCCCTGCCCCGCCCCGAGCTGCTGGGC
GGCCCCAGCGTGTTCTGTTCCCCCCAAGCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGC
ACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAGGACCCCGAGGTGAA
GTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCCGCG
AGGAGCAGTACAACAGCACCTACCGCGTGGTGGAGCGTGTGACCGTGTGACCCAG
GACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGAGCAACAAGGCCCTGCCCGC
CCCCATCGAGAAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCCCAGGTGT
ACACCCTGCCCCCAGCCGCGACGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGC
CTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCA
GCCCCGAGAACA ACTACAAGACCACCCCCCGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCT
TCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCCGCTGGCAGCAGGGCAACGTGTTC
AGCTGCAGCGTGTGACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTGAG
CCTGAGCCCCGGCTAACTCGAGAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATT
GACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATG
CCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATC
CTGGTTAGTTCTTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCTGCCTTGCCCGCTGCTGGAC
AGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATCCGTGGTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCA
TCTGTTGTTTGCCCCCTCCCCCGTGCTTCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTG

TCCTTTCCTAATAAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTA
 TTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAG
 CAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGGCGGCCGCAGGAACCCCTAGTGAT
 GGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAA
 GGTCGCCCCGACGCCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCG

(SEQ ID NO: 51)

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид включает или состоит из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 52 или нуклеотидной последовательности, обладающей по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с ней.

CGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTG
 GTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATC
 ACTAGGGGTTCTGGCGCGCCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTA
 ACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCC
 CACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAAT
 GACGGTAAATGGCCCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTT
 ACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTTCGAGGTGAGCCCC
 ACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTTTGTATTTATT
 TATTTTTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGC
 CAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGG
 CGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGGCGG
 CGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGGCGGGAGTCGCTGCGCGCTG
 CCTTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCGCGCCGCTCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACT
 GACCGCGTTACTCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAA
 TTAGCGCTTGGTTTAATGACGGCTTGTTCCTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTGAG
 GGGCTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGAGCGGCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGG
 ACGGCTGCCTTCGGGGGGGACGGGGCAGGGCGGGGTTTCGGCTTCTGGCGTGTGACC
 GGCGGCTCTAGAGCCTCTGCTAACCATGTTTCATGCCTTCTTCTTTTCTACAGCTCC
 TGGGCAACGTGCTGGTTATTGTGCTGTCTCATATTTGGCAAAGAATTGGATCCAC
 TAGTGCCACCATGCGCCTGCTGGCCAAGATCATCTGCCTGATGCTGTGGGCCATCTG
 CGTGGCCAGCGACACCGGCCGCCCTTCGTGGAGATGTACAGCGAGATCCCCGAGA
 TCATCCACATGACCGAGGGCCGCGAGCTGGTGTATCCCCTGCCGCGTGACCAGCCCC
 AACATCACCGTGACCCTGAAGAAGTTCCTCCCTGGACACCCTGATCCCCGACGGCAA
 GCGCATCATCTGGGACAGCCGCAAGGGCTTCATCATCAGCAACGCCACCTACAAGG
 AGATCGGCTGCTGACCTGCGAGGCCACCGTGAACGGCCACCTGTACAAGACCAAC
 TACCTGACCCACCGCCAGACCAACACCATCATCGACGTGGTGCTGAGCCCCAGCCA
 CGGCATCGAGCTGAGCGTGGGCGAGAAGCTGGTGCTGAACTGCACCGCCCCGACCG
 AGCTGAACGTGGGCATCGACTTCAACTGGGAGTACCCAGCAGCAAGCACCAGCAC
 AAGAAGCTGGTGAACCGCGACCTGAAGACCCAGAGCGGCAGCGAGATGAAGAAGT
 TCCTGAGCACCTGACCATCGACGGCGTGACCCGCGAGCGACCAGGGCCTGTACACC

TGCGCCGCCAGCAGCGGCCTGATGACCAAGAAGAACAGCACCTTCGTGCGCGTGCA
CGAGAAGGACAAGACCCACACCTGCCCCCCTGCCCCGCCCCGAGCTGCTGGGCG
GCCCCAGCGTGTTCCTGTTCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGCA
CCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAGGACCCCGAGGTGAAG
TTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCCGCGA
GGAGCAGTACAACAGCACCTACCGCGTGGTGGAGCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGG
ACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGAGCAACAAGGCCCTGCCCCGCC
CCCATCGAGAAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCCCAGGTGTA
CACCTGCCCCCAGCCGCGACGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCC
TGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAG
CCCGAGAACAATAAAGACCACCCCCCGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTT
CCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCCGCTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCA
GCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCAGAAGAGCCTGAGC
CTGAGCCCCGGCTAACGAAGGAAACGAGGAAGCGGAGAAGCCAGACACAAACAGA
AAATTGTGGCACCGGTGAAACAGACTTTGAATTTTGACCTTCTCAAGTTGGCGGGAG
ACGTCGAGTCCAACCCTGGGCCCATGCGCCTCCTGGCCAAGATCATCTGCCTCATGC
TGTGGGCCATCTGCGTGGCTGAGGACTGCAATGAGCTGCCGCCAGGAGGAACACA
GAGATCCTGACAGGGAGCTGGTCTGACCAGACCTACCCTGAGGGCACCCAGGCGAT
CTACAAGTGCCGGCCGGGCTACAGGAGCCTGGGGAACATCATCATGGTGTGTAGAA
AGGGCGAATGGGTGGCCCTCAACCCCTGAGGAAGTGCCAGAAGCGGCCCTGTGGC
CACCCCGGGACACACCCTTCGGGACCTTCACCCTGACCGGGCGGCAATGTGTTTGAG
TACGGCGTGAAGGCTGTCTACACATGCAACGAGGGGTACCAGCTGCTGGGCGAGAT
TAACTACCGGGAGTGTGACACCGATGGGTGGACCAACGACATTCATCTGTGAGG
TGGTCAAGTGTCTCCCCGTGACAGCCCCAGAAAATGGCAAAATCGTGAGCAGCGCC
ATGGAGCCTGACCGCGAATATCACTTTGGGCAGGCCGTGAGGTTTGTGTGCAACTCG
GGCTACAAAATTGAAGGTGATGAGGAGATGCACTGCAGCGATGATGGCTTCTGGTC
CAAGGAGAAGCCCAAATGTGTGGAGATCTCCTGCAAGTCTCCCGACGTGATCAACG
GCAGCCCAATCAGCCAGAAGATTATTTACAAAGAGAACGAGCGCTTCCAGTACAAG
TGTAACATGGGCTATGAGTATTCAGAGAGGGGAGATGCCGTCTGCACTGAGAGCGG
CTGGAGACCACTGCCTAGCTGCGAGGAAAAGAGTTGTGACAACCCTTACATCCCAA
ATGGCGACTACTCCCCTCTGCGGATCAAACACCGGACCGGGGATGAAATCACCTAT
CAGTGCCGCAATGGATTCTACCCGGCCACCCGCGGCAACACCGCCAAATGCACCAG
CACAGGCTGGATCCCCGCCCCCGCTGTACGCTGAAGCCTTGCGACTATCCAGACAT
CAAGCACGGAGGCCTGTACCACGAAAACATGCGGCGGCCTTATTTCCCTGTGGCAG
TGGGGAAGTACTACAGCTACTACTGCGACGAGCACTTCGAGACCCCCCTCTGGCTCCT
ACTGGGACCACATCCACTGCACACAGGACGGCTGGTCTCCAGCTGTGCCCTGCCTGA
GGAAATGCTACTTCCCCTACCTGGAGAACGGATAACAACCAGAACTATGGCCGCAAG
TTCGTGCAGGGCAAGAGCATCGATGTGGCCTGCCACCCTGGCTACGCCCTGCCAAG
GCCAGACAACCTGTGACCTGCATGGAGAATGGTTGGAGCCCCACCCCGCGCTGCAT
CCGGGTGTCCTTCACGCTCCTCGAGAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAG

ATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTA
 ATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAA
 ATCCTGGTTAGTTCTTGCCACGGCGGAACATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTG
 GACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGTGCCTTCTAGTTGCCAG
 CCATCTGTTGTTTGCCCCCTCCCCCGTGCCTTCCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCA
 CTGTCCTTTCCTAATAAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATT
 CTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAA
 TAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGGCGGCCGCAGGAACCCCTAGT
 GATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACC
 AAAGGTCGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCG

(SEQ ID NO: 52)

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид включает или состоит из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 53 или нуклеотидной последовательности, обладающей по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с ней.

CGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTG
 GTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGCCAACTCCATC
 ACTAGGGGTTCTGGCGCGCCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTA
 ACGCCAATAGGGACTTTCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCC
 CACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAAT
 GACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCT
 ACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTCGAGGTGAGCCCC
 ACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTTTGTATTTATT
 TATTTTTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGC
 CAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGG
 CGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGG
 CGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGGCGGGGAGTCGCTGCGCGCTG
 CCTTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCCGCCCTCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACT
 GACCGCGTTACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAA
 TTAGCGCTTGGTTTAATGACGGCTTGTTCCTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTGAG
 GGGCTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGAGCGGCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGG
 ACGGCTGCCTTCGGGGGGGACGGGGCAGGGCGGGGTTTCGGCTTCTGGCGTGTGACC
 GGCGGCTCTAGAGCCTCTGCTAACCATGTTTCATGCCTTCTTCTTTTCTACAGCTCC
 TGGGCAACGTGCTGGTTATTGTGCTGTCTCATCATTTTGGCAAAGAATTGGATCCAC
 TAGTGCCACCATGCGCCTCCTGGCCAAGATCATCTGCCTCATGCTGTGGGCCATCTG
 CGTGGCTGAGGACTGCAATGAGCTGCCGCCAGGAGGAACACAGAGATCCTGACAG
 GGAGCTGGTCTGACCAGACCTACCCTGAGGGCACCCAGGCGATCTACAAGTGCCGG
 CCGGGCTACAGGAGCCTGGGGAACATCATCATGGTGTGTAGAAAGGGCGAATGGGT
 GGCCCTCAACCCCTGAGGAAGTGCCAGAAGCGGCCCTGTGGCCACCCCGGGGACA
 CACCCTTCGGGACCTTACCCTGACCGGCGGCAATGTGTTTGTAGTACGGCGTGAAGG

CTGTCTACACATGCAACGAGGGGTACCAGCTGCTGGGCGAGATTA ACTACCGGGAG
TGTGACACCGATGGGTGGACCAACGACATTCCCATCTGTGAGGTGGTCAAGTGTCTC
CCCGTGACAGCCCCAGAAAATGGCAAATCGTGAGCAGCGCCATGGAGCCTGACCG
CGAATATCACTTTGGGCAGGCCGTGAGGTTTGTGTGCAACTCGGGCTACAAAATTGA
AGGTGATGAGGAGATGCACTGCAGCGATGATGGCTTCTGGTCCAAGGAGAAGCCCA
AATGTGTGGAGATCTCCTGCAAGTCTCCCGACGTGATCAACGGCAGCCCAATCAGCC
AGAAGATTATTTACAAAGAGAACGAGCGCTTCCAGTACAAGTGTAACATGGGCTAT
GAGTATTCAGAGAGGGGAGATGCCGTCTGCACTGAGAGCGGCTGGAGACCACTGCC
TAGCTGCGAGGAAAAGAGTTGTGACAACCCTTACATCCCAAATGGCGACTACTCCC
CTCTGCGGATCAAACACCGGACCGGGGATGAAATCACCTATCAGTGCCGCAATGGA
TTCTACCCGGCCACCCGCGGCAACACCGCCAAATGCACCAGCACAGGCTGGATCCC
CGCCCCCGCTGTACGCTGAAGCCTTGC GACTATCCAGACATCAAGCACGGAGGCCT
GTACCACGAAAACATGCGGCGGCCTTATTTCCCTGTGGCAGTGGGGAAGTACTACA
GCTACTACTGCGACGAGCACTTCGAGACCCCCTCTGGCTCCTACTGGGACCACATCC
ACTGCACACAGGACGGCTGGTCTCCAGCTGTGCCCTGCCTGAGGAAATGCTACTTCC
CCTACCTGGAGAACGGATAACAACCAGAACTATGGCCGCAAGTTCGTGCAGGGCAAG
AGCATCGATGTGGCCTGCCACCCTGGCTACGCCCTGCCCAAGGCCAGACA ACTGTG
ACCTGCATGGAGAATGGTTGGAGCCCCACCCGCGCTGCATCCGGGTGTCCTTCACG
CTCCGAAGGAAACGAGGAAGCGGAGAAGCCAGACACAAACAGAAAATTGTGGCAC
CGGTGAAACAGACTTTGAATTTTGACCTTCTCAAGTTGGCGGGAGACGTTCGAGTCCA
ACCCTGGGCCCATGCGCCTGCTGGCCAAGATCATCTGCCTGATGCTGTGGGCCATCT
GCGTGGCCAGCGACACCGGCCGCCCCTTCGTGGAGATGTACAGCGAGATCCCCGAG
ATCATCCACATGACCGAGGGCCGCGAGCTGGTGTATCCCCTGCCGCGTGACCAGCCC
CAACATCACCGTGACCCTGAAGAAGTTCCCCCTGGACACCCTGATCCCCGACGGCA
AGCGCATCATCTGGGACAGCCGCAAGGGCTTCATCATCAGCAACGCCACCTACAAG
GAGATCGGCCTGCTGACCTGCGAGGCCACCGTGAACGGCCACCTGTACAAGACCAA
CTACCTGACCCACCGCCAGACCAACACCATCATCGACGTGGTGTGAGCCCCAGCC
ACGGCATCGAGCTGAGCGTGGGCGAGAAGCTGGTGTGAACTGCACCGCCCCGACCC
GAGCTGAACGTGGGCATCGACTTCAACTGGGAGTACCCAGCAGCAAGCACCAGCA
CAAGAAGCTGGTGAACCGCGACCTGAAGACCCAGAGCGGCAGCGAGATGAAGAAG
TTCCTGAGCACCTGACCATCGACGGCGTGACCCGCGAGCGACCAGGGCCTGTACAC
CTGCGCCGCCAGCAGCGGCCTGATGACCAAGAAGAACAGCACCTTCGTGCGCGTGC
ACGAGAAGGACAAGACCCACACCTGCCCCCCTGCCCCGCCCCGAGCTGCTGGGC
GGCCCCAGCGTGTTCTGTTCACCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGC
ACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAGGACCCCGAGGTGAA
GTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCCGCG
AGGAGCAGTACAACAGCACCTACCGCGTGGTGTGAGCGTGTGACCGTGTGACCCAG
GACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGAGCAACAAGGCCCTGCCCGC
CCCCATCGAGAAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCCCAGGTGT
ACACCCTGCCCCCAGCCGCGACGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGC

CTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCA
 GCCCGAGAACAАCTACAAGACCACCCCCCGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCT
 TCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCCGCTGGCAGCAGGGCAACGTGTTC
 AGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTGAG
 CCTGAGCCCCGGCTAACTCGAGGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCC
 TCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTTCCTAATAAA
 ATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGG
 TGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGA
 TGCGGTGGGCTCTATGGGCGGCCGCAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCC
 CTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCCGACGCC
 GGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCG

(SEQ ID NO: 53)

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид включает или состоит из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 54 или нуклеотидной последовательности, обладающей по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с ней.

CGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTG
 GTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAАCTCCATC
 АCTAGGGGTTCTGGCGCGCCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTA
 АCGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCC
 СACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAAT
 GACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCT
 АCTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTTCGAGGTGAGCCCC
 АCGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTTTGTATTTATT
 TATTTTTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGC
 CAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGG
 CGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGG
 CGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGGCGGGAGTCGCTGCGCGCTG
 CCTTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCCGCCCTCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACT
 GACCGCGTTACTCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAA
 TTAGCGCTTGGTTTAATGACGGCTTGTTCCTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTGAG
 GGGCTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGAGCGGCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGG
 АCGGCTGCCTTCGGGGGGGACGGGGCAGGGGCGGGGTTTCGGCTTCTGGCGTGTGACC
 GGCGGCTCTAGAGCCTCTGCTAАCCATGTTСATGCCTTCTTCTTTTCTACAGCTCC
 TGGGCAACGTGCTGGTTATTGTGCTGTCTCATATTTGGCAAAGAATTGGATCCAC
 TAGTGCCACCATGCGCCTGCTGGCCAAGATCATCTGCCTGATGCTGTGGGCCATCTG
 CGTGGCCAGCGACACCGGCCGCCCTTCGTGGAGATGTACAGCGAGATCCCCGAGA
 TCATCCACATGACCGAGGGCCGCGAGCTGGTGATCCCCTGCCGCGTGACCAGCCCC
 AACATCACCGTGACCCTGAAGAAGTTCCTCCCTGGACACCCTGATCCCCGACGGCAA
 GCGCATCATCTGGGACAGCCGCAAGGGCTTCATCATCAGCAACGCCACCTACAAGG

AGATCGGCCTGCTGACCTGCGAGGCCACCGTGAACGGCCACCTGTACAAGACCAAC
TACCTGACCCACCGCCAGACCAACACCATCATCGACGTGGTGCTGAGCCCCAGCCA
CGGCATCGAGCTGAGCGTGGGCGAGAAGCTGGTGCTGAACTGCACCGCCCCGCACCG
AGCTGAACGTGGGCATCGACTTCAACTGGGAGTACCCAGCAGCAAGCACCAGCAC
AAGAAGCTGGTGAACCGCGACCTGAAGACCCAGAGCGGCAGCGAGATGAAGAAGT
TCCTGAGCACCTGACCATCGACGGCGTGACCCGCAGCGACCAGGGCCTGTACACC
TGCGCCGCCAGCAGCGGCCTGATGACCAAGAAGAAGCAGCACCTTCGTGCGCGTGCA
CGAGAAGGACAAGACCCACACCTGCCCCCCTGCCCCGCCCCGAGCTGCTGGGCG
GCCCCAGCGTGTTCCTGTTCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGCA
CCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAGGACCCCGAGGTGAAG
TTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCCGCGA
GGAGCAGTACAACAGCACCTACCGCGTGGTGGAGCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGG
ACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGAGCAACAAGGCCCTGCCCGCC
CCCATCGAGAAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCCCAGGTGTA
CACCTGCCCCCCAGCCGCGACGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCC
TGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAG
CCCGAGAACAATAAGACCAACCCCCCGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTT
CCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCCGCTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCA
GCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCAGAAGAGCCTGAGC
CTGAGCCCCGGCTAACGAAGGAAACGAGGAAGCGGAGAAGCCAGACACAAACAGA
AAATTGTGGCACCGGTGAAACAGACTTTGAATTTTGACCTTCTCAAGTTGGCGGGAG
ACGTCGAGTCCAACCCTGGGCCCATGCGCCTCCTGGCCAAGATCATCTGCCTCATGC
TGTGGGCCATCTGCGTGGCTGAGGACTGCAATGAGCTGCCGCCAGGAGGAACACA
GAGATCCTGACAGGGAGCTGGTCTGACCAGACCTACCCTGAGGGCACCCAGGCGAT
CTACAAGTGCCGGCCGGGCTACAGGAGCCTGGGGAACATCATCATGGTGTGTAGAA
AGGGCGAATGGGTGGCCCTCAACCCCTGAGGAAGTGCCAGAAGCGGCCCTGTGGC
CACCCCGGGACACACCCTTCGGGACCTTCACCCTGACCGGCGGCAATGTGTTTGAG
TACGGCGTGAAGGCTGTCTACACATGCAACGAGGGGTACCAGCTGCTGGGCGAGAT
TAACTACCGGGAGTGTGACACCGATGGGTGGACCAACGACATTCATCTGTGAGG
TGGTCAAGTGTCTCCCCGTGACAGCCCCAGAAAATGGCAAATCGTGAGCAGCGCC
ATGGAGCCTGACCGCGAATATCACTTTGGGCAGGCCGTGAGGTTTGTGTGCAACTCG
GGCTACAAAATTGAAGGTGATGAGGAGATGCACTGCAGCGATGATGGCTTCTGGTC
CAAGGAGAAGCCCAAATGTGTGGAGATCTCCTGCAAGTCTCCCGACGTGATCAACG
GCAGCCCAATCAGCCAGAAGATTATTTACAAAGAGAACGAGCGCTTCCAGTACAAG
TGTAACATGGGCTATGAGTATTCAGAGAGGGGAGATGCCGTCTGCACTGAGAGCGG
CTGGAGACCACTGCCTAGCTGCGAGGAAAAGAGTTGTGACAACCCTTACATCCCAA
ATGGCGACTACTCCCTCTGCGGATCAAACACCGGACCGGGGATGAAATCACCTAT
CAGTGCCGCAATGGATTCTACCCGGCCACCCGCGGCAACACCGCCAAATGCACCAG
CACAGGCTGGATCCCCGCCCCCGCTGTACGCTGAAGCCTTGCGACTATCCAGACAT
CAAGCACGGAGGCCTGTACCACGAAAACATGCGGCGGCCTTATTTCCCTGTGGCAG

TGGGGAAGTACTACAGCTACTACTGCGACGAGCACTTCGAGACCCCCTCTGGCTCCT
 ACTGGGACCACATCCACTGCACACAGGACGGCTGGTCTCCAGCTGTGCCCTGCCTGA
 GGAAATGCTACTTCCCCTACCTGGAGAACGGATACAACCAGAACTATGGCCGCAAG
 TTCGTGCAGGGCAAGAGCATCGATGTGGCCTGCCACCCTGGCTACGCCCTGCCCAAG
 GCCCAGACAACCTGTGACCTGCATGGAGAATGGTTGGAGCCCCACCCCGCGCTGCAT
 CCGGGTGTCTTCACGCTCCTCGAGGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGC
 CCTCCCCCGTGCCTTCCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCTTTCCTAAT
 AAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTG
 GGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGG
 GGATGCGGTGGGCTCTATGGGCGGCCGCAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCAC
 TCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCCGACG
 CCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCG

(SEQ ID NO: 54)

Структура глаза

Лекарственные средства, раскрытые в настоящем документе, можно доставлять в глаз млекопитающего, предпочтительно человека, при лечении или профилактике заболевания глаз, такого как возрастная макулодистрофия (ВМД).

Специалист в области лечения заболеваний глаз будет иметь подробное и полное представление о строении глаза. Однако ниже описаны следующие структуры, имеющие особое значение для изобретения.

Сетчатка

Сетчатка глаза представляет собой многослойную ткань, которая выстилает внутреннюю поверхность задней камеры глаза и воспринимает изображение видимого мира, которое передается в мозг через зрительный нерв. В порядке от внутренней части глаза к внешней поверхности, сетчатка состоит из слоев нейросенсорной сетчатки и пигментного эпителия сетчатки, при этом сосудистая оболочка располагается дистально относительно пигментного эпителия сетчатки.

Нейросенсорная сетчатка и фоторецепторные клетки

Нейросенсорная сетчатка содержит фоторецепторные клетки, которые непосредственно воспринимают свет. Она включает следующие слои: внутреннюю пограничную мембрану (ВПМ); слой нервных волокон; слой ганглионарных клеток; внутренний сплетениевидный слой; внутренний ядерный слой; наружный сплетениевидный слой; наружный ядерный слой (ядра фоторецепторов); наружную пограничную мембрану (НПМ); и внутренние и внешние сегменты палочек и колбочек.

Специалист в данной области будет иметь детальное представление о фоторецепторных клетках. Вкратце, фоторецепторные клетки представляют собой специализированные нейроны, расположенные в сетчатке, которые преобразуют свет в биологические сигналы. Фоторецепторные клетки состоят из палочек и колбочек, которые с разной плотностью распределены по сетчатке.

Палочковые клетки распределены преимущественно по периферическим отделам

сетчатки. Они очень чувствительны и обеспечивают зрение при низком уровне освещенности. В нормальной сетчатке человека содержится в среднем около 125 миллионов палочковых клеток.

Колбочковые клетки распределены по всей сетчатке, но их особенно много в центральной ямке, углублении в нейросенсорной сетчатке, которая отвечает за центральное зрение высокого разрешения. Колбочки менее чувствительны, чем палочки, и отвечают за цветное зрение. В нормальной сетчатке человека содержится в среднем около 6-7 миллионов колбочек.

Пигментный эпителий сетчатки

Пигментный эпителий сетчатки (ПЭС) представляет собой пигментированный слой клеток, расположенных непосредственно снаружи нейросенсорной сетчатки, примыкающих к наружным сегментам фоторецепторов. ПЭС отделяет нейросенсорную сетчатку от сосудистой оболочки и выполняет такие функции, как рециркуляция зрительного пигмента из внешних сегментов фоторецепторов. ПЭС выполняет ряд функций, включающих транспортировку питательных и других веществ к фоторецепторным клеткам, и поглощение рассеянного света для улучшения зрения.

Сосудистая оболочка

Сосудистая оболочка глаза представляет собой сосудистый слой, расположенный между ПЭС и наружной склерой глаза. Сосудистая сеть хориоидеи обеспечивает снабжение сетчатки кислородом и питательными веществами.

Возрастная макулодистрофия (ВМД)

Клиническое течение возрастной макулодистрофии (ВМД) характеризуется стадиями, соответствующими изменениям в желтом пятне. Отличительным признаком ранней ВМД является появление друз, которые представляют собой скопления внеклеточного дебриса под сетчаткой и проявляются в виде желтых точек на сетчатке при клиническом осмотре и на фотографиях глазного дна. Друзы подразделяются по размеру на мелкие (<63 мкм), средние (63-124 мкм) и крупные (>124 мкм). Они также считаются твердыми или мягкими в зависимости от внешнего вида их краев при офтальмологическом осмотре. Тогда как твердые друзы имеют четко очерченные края, мягкие друзы имеют менее четкие, подвижные края. Шкала для оценки тяжести возрастных заболеваний глаз при исследовании глазного дна (AREDS) является одной из основных систем классификации, используемых для этого состояния.

ВМД подразделяют на "сухую" и "влажную" (экссудативную или неоваскулярную) формы. Сухая форма ВМД обычно характеризуется прогрессирующей гибелью клеток в слое ПЭС, покрывающем клетки фоторецепторов, и часто также нижележащих клеток в слое капилляров хориоидеи. Сливающиеся участки гибели клеток РПЭ, сопровождающиеся атрофией вышележащих фоторецепторов, называются географической атрофией (ГА). У пациентов с этой формой ВМД наблюдается медленное и прогрессирующее ухудшение центрального зрения.

Влажная форма ВМД характеризуется кровотечением и/или повышенной

проницаемостью аномальных сосудов, которые выросли из хориоидальных сосудов (хориокапилляров) под ПЭС и макулой, что может быть причиной внезапной и инвалидизирующей потери зрения. Было подсчитано, что основная часть случаев потери зрения, которую испытывают пациенты, связана с такой хориоидальной неоваскуляризацией (ХНВ) и ее вторичными осложнениями.

Лечение или профилактика ВМД, описанные в настоящем документе, могут уменьшать или предотвращать появление фенотипа ВМД, описанного выше. Предпочтительно лечение ВМД позволяет сохранить или улучшить зрительную функцию.

В некоторых вариантах осуществления лечение или профилактика ВМД приводит к предотвращению или уменьшению образования географической атрофии. В других вариантах осуществления лечение или профилактика ВМД приводит к замедлению прогрессирования географической атрофии. Например, это приводит к уменьшению увеличения площади ГА по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% в течение 12 месяцев после введения препарата в подвергнутом лечению глазу субъекта по сравнению с необработанным глазом за тот же период. В других вариантах осуществления лечение или профилактика ВМД приводит к лечению географической атрофии, например, к уменьшению уровня географической атрофии.

В некоторых вариантах осуществления лечение или профилактика ВМД приводит к предотвращению или уменьшению образования друз. В других вариантах осуществления лечение или профилактика ВМД приводит к уменьшению существующих друз, например, к уменьшению размера и/или количества существующих друз.

В некоторых вариантах осуществления лечение или профилактика ВМД приводит к предотвращению или уменьшению отложения комплемента. В других вариантах осуществления лечение или профилактика ВМД приводит к снижению существующего отложения комплемента.

В некоторых вариантах осуществления лечение или профилактика ВМД приводит к улучшению или восстановлению зрения или остроты зрения. В других вариантах осуществления лечение или профилактика ВМД уменьшает потерю зрения или остроты зрения.

В некоторых вариантах осуществления лечение или профилактика ВМД приводит к улучшению или восстановлению скорости чтения у субъекта. В других вариантах осуществления лечение или профилактика ВМД уменьшает снижение скорости чтения у субъекта.

В некоторых вариантах осуществления лечение или профилактика ВМД приводит к уменьшению или предотвращению потери фоторецепторов и/или пигментного эпителия сетчатки (ПЭС).

Диабетическая ретинопатия

Диабетическая ретинопатия - состояние, характеризующееся повреждением кровеносных сосудов сетчатки, которое вызвано высокими уровнями сахара в крови, связанными с диабетом. При отсутствии лечения диабетическая ретинопатия может

привести к слепоте.

Хотя субъекты с легкой диабетической ретинопатией могут иметь хорошее зрение, некоторые типы диабетической ретинопатии, а именно диабетический макулярный отек (ДМО) и пролиферативная диабетическая ретинопатия (ПДР), могут угрожать зрению субъекта.

Диабетический макулярный отек характеризуется транссудацией жидкости из поврежденных кровеносных сосудов в заднюю часть глаза. Транссудат скапливается в макуле, что приводит к отеку и снижению четкости зрения. В конечном итоге это может привести к ухудшению центрального зрения и неспособности читать или водить машину. Боковое зрение обычно остается нормальным.

Пролиферативная диабетическая ретинопатия характеризуется перекрыванием кровеносных сосудов сетчатки, что приводит к росту аномальных хрупких кровеносных сосудов на поверхности сетчатки. Это может приводить к необратимой потере зрения из-за кровоизлияния в глаз, рубцевания и отслойки сетчатки. Непролиферативная ретинопатия является ранней стадией диабетической ретинопатии, которая может приводить к пролиферативной ретинопатии, если не применять лечения. Поэтому лечение предусматривается для всех стадий и типов диабетической ретинопатии.

Векторы

Вектор представляет собой инструмент, который обеспечивает или облегчает перенос молекулы из одной среды в другую.

Векторы на основе аденоассоциированного вируса (AAV)

В одном аспекте изобретения предложен вектор на основе AAV, включающий полинуклеотид согласно изобретению.

Предпочтительно вектор на основе AAV находится в форме векторной частицы AAV.

Способы получения и модификации вирусных векторов и вирусных векторных частиц, например, на основе AAV, хорошо известны в уровне техники.

Вектор на основе AAV может включать геном AAV или его фрагмент или производное.

Полинуклеотид, включающий нуклеотидные последовательности, кодирующие: (i) молекулу против VEGF и (ii) негативный регулятор комплемента, предложенные в настоящем изобретении, может подходить для упаковки в AAV. Как известно, AAV позволяет упаковывать геномы размером до 5,2 тн (Dong, J.-Y. et al. (1996) *Human Gene Therapy* 7: 2101-2112).

Таким образом, нуклеотидные последовательности, кодирующие молекулу против VEGF и негативный регулятор комплемента, могут быть выбраны таким образом, чтобы комбинация подходила для упаковки в AAV. В некоторых вариантах осуществления функциональные фрагменты молекулы против VEGF и/или негативного регулятора комплемента (например, описанные в настоящем документе) могут применяться для гарантии того, что полинуклеотид будет подходящим для упаковки в AAV.

В некоторых вариантах осуществления длина полинуклеотида меньше или равна 5,2, 5,1, 5,0, 4,9, 4,8 или 4,7 тн. В предпочтительных вариантах осуществления настоящий полинуклеотид меньше или равен 4,7 тн.

Геном AAV представляет собой полинуклеотидную последовательность, которая может кодировать функции, необходимые для получения частицы AAV. Эти функции включают такие, которые действуют в цикле репликации и упаковки AAV в клетке-хозяине, включая инкапсидирование генома AAV в частице AAV. Природные AAV репликационно-дефицитные и зависят от предоставления хелперных функций в транс-конфигурации для завершения цикла репликации и упаковки. Таким образом, геном AAV вектора AAV согласно изобретению обычно репликационно-дефицитный.

Геном AAV может быть в одноцепочечной форме, положительно или отрицательно-полярной, или, в альтернативе, в двухцепочечной форме.

Геном AAV может происходить из любого природного серотипа, изолята или клады AAV. Таким образом, геном AAV может быть полным геномом природного AAV. Как известно специалисту, природные AAV могут быть классифицированы в соответствии с различными биологическими системами.

Как правило, AAV обозначают по их серотипу. Серотип соответствует варианту подвида AAV, который вследствие своего профиля экспрессии капсидных поверхностных антигенов обладает характерной реактивностью, которая может использоваться для определения его отличий от других вариантов подвидов. Как правило, вирус, имеющий определенный серотип AAV, не дает эффективной перекрестной реакции с нейтрализующими антителами, специфичными к какому-либо другому серотипу AAV.

Серотипы AAV включают AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10 и AAV11, а также рекомбинантные серотипы, такие как Rec2 и Rec3, недавно идентифицированные в головном мозге у приматов. Любой из этих серотипов AAV может применяться в изобретении.

В некоторых вариантах осуществления векторная частица AAV представляет собой векторную частицу AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rec2, Rec3, Rh10, DJ или Anc65 AAV.

В некоторых вариантах осуществления векторная частица AAV может включать капсид AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10 или AAV11.

В некоторых вариантах осуществления AAV может быть серотипом AAV1, AAV2, AAV5, AAV7 или AAV8.

В некоторых вариантах осуществления AAV может быть серотипом AAV2 или AAV8.

В некоторых вариантах осуществления AAV может быть серотипом AAV2. В других предпочтительных вариантах осуществления AAV может быть серотипом AAV8.

Капсидный белок может быть мутантным капсидным белком, таким как раскрытый в WO 2008/124724, которая включена в настоящий документ посредством отсылки.

В некоторых вариантах осуществления вектор AAV включает капсид AAV8 с мутацией Y733F.

Обзоры серотипов AAV можно найти в Choi et al. (2005) *Curr. Gene Ther.* 5: 299-310 и Wu et al. (2006) *Molecular Therapy* 14: 316-27. Последовательности геномов AAV или элементов геномов AAV, включая последовательности ITR, гены гер или сар, для применения в изобретении могут быть получены из полногеномных последовательностей AAV под следующими номерами доступа: Аденоассоциированный вирус 1 NC_002077, AF063497; Аденоассоциированный вирус 2 NC_001401; Аденоассоциированный вирус 3 NC_001729; Аденоассоциированный вирус 3В NC_001863; Аденоассоциированный вирус 4 NC_001829; Аденоассоциированный вирус 5 Y18065, AF085716; Аденоассоциированный вирус 6 NC_001862; AAV птиц ATCC VR-865 AY186198, AY629583, NC_004828; штамм AAV птиц DA-1 NC_006263, AY629583; AAV крупного рогатого скота NC_005889, AY388617.

AAV также может быть указан по кладам или клонам. Это связано с филогенетическим родством природных AAV и, как правило, относится к филогенетической группе AAV, которая восходит к общему предку и включает всех его потомков. Кроме того, AAV могут быть указаны по конкретному изоляту, то есть генетическому изоляту конкретного AAV, встречающегося в природе. Термин "генетический изолят" описывает популяцию вирусов AAV, которая подверглась ограниченному генетическому смешению с другими природными AAV, с определением в результате распознаваемой отличающейся популяции на генетическом уровне.

Специалист в данной области может выбрать подходящий серотип, кладу, клон или изолят AAV для применения в изобретении на основе своих общих знаний. Например, было показано, что капсид AAV5 эффективно трансдуцирует фоторецепторы колбочек приматов, что подтверждалось успешной коррекцией наследственного нарушения цветового зрения (Mancuso et al. (2009) *Nature* 461: 784-7).

Серотип AAV определяет тканевую специфичность инфекции (или тропизм) AAV. Соответственно, предпочтительными серотипами AAV для применения в AAV, вводимых пациентам в соответствии с изобретением, являются такие серотипы, которые обладают природным тропизмом или высокой эффективностью инфицирования клеток-мишеней в глазу. В некоторых вариантах осуществления серотипы AAV для применения в изобретении представляют собой такие серотипы, которые трансдуцируют клетки нейросенсорной сетчатки, пигментного эпителия сетчатки и/или хориоидеи.

Как правило, геном AAV природного серотипа, изолята или клады AAV включает по меньшей мере одну последовательность инвертированного концевого повтора (ITR). Последовательность ITR действует в цис-конфигурации, обеспечивая функциональное начало репликации, и обеспечивает возможность интеграции и вырезания вектора из генома клетки. В предпочтительных вариантах осуществления одна или больше последовательностей ITR фланкируют нуклеотидные последовательности, кодирующие молекулу против VEGF и негативный регулятор комплемента. Геном AAV обычно также

включает гены упаковки, такие как гены *rep* и/или *cap*, которые кодируют функции упаковки для частицы AAV. Ген *rep* кодирует один или больше белков Rep78, Rep68, Rep52 и Rep40 или их варианты. Ген *cap* кодирует один или больше капсидных белков, таких как VP1, VP2 и VP3 или их варианты. Эти белки формируют капсид частицы AAV. Варианты капсидов обсуждаются ниже.

Промотор будет функционально связан с каждым из генов упаковки. Конкретные примеры таких промоторов включают промоторы p5, p19 и p40 (Laughlin et al. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 5567-5571). Например, промоторы p5 и p19 обычно используются для экспрессии гена *rep*, тогда как промотор p40 обычно используется для экспрессии гена *cap*.

Как обсуждалось выше, геном AAV, применяемый в векторе AAV согласно изобретению, может быть, таким образом, полным геномом природного AAV. Например, векторы, которые в совокупности включают полный геном AAV, могут применяться для получения вектора или векторной частицы AAV *in vitro*. Впрочем, не смотря на то, что такой вектор в принципе можно вводить пациентам, на практике это делают редко. Предпочтительно геном AAV будет дериватизирован с целью введения пациентам. Такая дериватизация является стандартной в данной области, и изобретение охватывает применение любого известного производного на основе генома AAV, а также производных, которые можно получить с помощью методов, известных в данной области. Дериватизация генома AAV и капсида AAV рассмотрена в обзоре Coura and Nardi (2007) *Virology Journal* 4:99, а также в публикациях Choi et al. и Wu et al., указанных выше.

Производные генома AAV включают любые усеченные или модифицированные формы генома AAV, которые обеспечивают экспрессию трансгена с вектора AAV согласно изобретению *in vivo*. Как правило, можно значительно уменьшить размер генома AAV, чтобы он включал минимальную вирусную последовательность, но при этом сохранял вышеуказанную функцию. Это является предпочтительным исходя из соображений безопасности, чтобы снизить риск рекомбинации вектора с вирусом дикого типа, а также избежать запуска клеточного иммунного ответа, вызванного присутствием белков с вирусного гена в клетке-мишени.

Как правило, производное будет включать по меньшей мере одну последовательность инвертированного концевого повтора (ITR), предпочтительно больше одного ITR, например, два ITR или больше. Один или больше ITR могут быть получены из геномов AAV, имеющих разные серотипы, или могут быть химерными или мутантными ITR. Предпочтительным мутантным ITR является ITR с делецией *trs* (сайта концевого разрешения). Эта делеция обеспечивает непрерывную репликацию генома с образованием одноцепочечного генома, который содержит как кодирующие, так и комплементарные последовательности, то есть самокомплементарный геном AAV. Это позволяет пропустить этап репликации ДНК в клетке-мишени и, таким образом, ускорить экспрессию трансгена.

Один или больше ITR предпочтительно будут фланкировать нуклеотидную

последовательность, кодирующую молекулу против VEGF и негативный регулятор комплемента, на любом из концов. Включение одного или больше ITR предпочтительно для облегчения образования конкатамера вектора согласно изобретению в ядре клетки-хозяина, например, после превращения одноцепочечной векторной ДНК в двухцепочечную ДНК при воздействии ДНК-полимераз клетки-хозяина. Образование таких эписомных конкатамеров защищает векторную конструкцию в течение жизненного цикла клетки-хозяина, обеспечивая в результате длительную экспрессию трансгена *in vivo*.

В предпочтительных вариантах осуществления элементы ITR будут единственными последовательностями, остающимися из нативного генома AAV в производном. Таким образом, производное предпочтительно не будет включать гены *her* и/или *cap* из нативного генома, и какие-либо другие последовательности нативного генома. Это предпочтительно по причинам, описанным выше, а также для уменьшения возможности интеграции вектора в геном клетки-хозяина. Кроме того, уменьшение размера генома AAV позволяет повысить гибкость при включении других элементов последовательности (таких как регуляторные элементы) в вектор в дополнение к трансгену.

Таким образом, в производном согласно изобретению могут быть удалены следующие части: гены репликации (*her*) и капсида (*cap*). Однако в некоторых вариантах осуществления производные могут дополнительно включать один или больше генов *her* и/или *cap* или других вирусных последовательностей из генома AAV. Природный AAV с высокой частотой интегрируется в специфический участок хромосомы 19 человека и демонстрирует крайне низкую частоту случайной интеграции, поэтому сохранение интегративной способности вектора можно допустить в терапевтических условиях.

Если производное включает капсидные белки, то есть VP1, VP2 и/или VP3, производное может быть химерным, смешанным или имеющим модифицированный капсид производным одного или больше природных AAV. В частности, изобретение охватывает предоставление последовательностей капсидных белков из разных серотипов, клад, клонов или изолятов AAV в одном и том же векторе (т.е. псевдотипированном векторе).

Химерные, смешанные или имеющие модифицированный капсид производные обычно выбирают для обеспечения одного или больше требуемых функциональных свойств вектора AAV. Таким образом, эти производные могут демонстрировать повышенную эффективность доставки генов, пониженную иммуногенность (гуморальную или клеточную), измененный спектр тропизма и/или улучшенную специфичность в отношении определенного типа клеток по сравнению с вектором AAV, включающим природный геном AAV, такой как геном AAV2 или AAV8. Повышение эффективности доставки генов может быть достигнуто за счет улучшения связывания рецепторов или корецепторов на клеточной поверхности, улучшения интернализации, улучшения транспорта в клетку и в ядро, улучшенное сбрасывание оболочки с вирусной частицы и улучшенное превращение одноцепочечного генома в двухцепочечную форму. Повышение

эффективности также может быть связано с измененным спектром тропизма или специфичности в отношении конкретной клеточной популяции, в результате чего доза вектора не разбавляется при введении в ткани, когда это не требуется.

Химерные капсидные белки включают белки, получаемые в результате рекомбинации между двумя или больше кодирующими капсид последовательностями из природных серотипов AAV. Это может быть осуществлено, например, с помощью метода спасения маркеров, при котором неинфекционные капсидные последовательности одного серотипа котрансфицируют с капсидными последовательностями другого серотипа, и используют направленную селекцию для отбора капсидных последовательностей, обладающих требуемыми свойствами. Капсидные последовательности разных серотипов могут быть изменены путем гомологичной рекомбинации в клетке с получением новых химерных капсидных белков.

Химерные капсидные белки также включают белки, созданные с помощью инженерии последовательностей капсидных белков для переноса специфических доменов капсидных белков, поверхностных петель или специфических аминокислотных остатков между двумя или более капсидными белками, например, между двумя или более капсидными белками разных серотипов.

Смешанные или химерные капсидные белки также могут быть получены путем перетасовки ДНК или с помощью ПЦР сниженной точности. Гибридные капсидные гены AAV могут быть созданы путем случайной фрагментации последовательностей родственных генов AAV, например, последовательностей, которые кодируют капсидные белки нескольких разных серотипов, а затем фрагменты повторно собирают в самопраймирующейся полимеразной реакции, что также может вызывать кроссовер в областях гомологии последовательностей. Библиотека гибридных генов AAV, созданная таким способом перетасовки капсидных генов нескольких серотипов, может быть подвергнута скринингу для идентификации вирусных клонов, обладающих нужной функциональностью. Аналогичным образом, ПЦР сниженной точности можно использовать для случайной мутации генов капсида AAV с целью создания разнообразной библиотеки вариантов, которые затем можно отбирать по необходимому свойству.

Последовательности капсидных генов также могут быть генетически модифицированы для введения специфических делеций, замен или вставок по отношению к нативной последовательности дикого типа. В частности, гены капсида можно модифицировать путем вставки последовательности неродственного белка или пептида в открытую рамку считывания последовательности, кодирующей капсид, на N- и/или C-конце кодирующей капсид последовательности. Это может быть сделано, например, для придания или изменения тропизма по отношению к специфическим клеточным рецепторам.

Неродственный белок или пептид предпочтительно может действовать как лиганд для определенного типа клеток, обеспечивая, таким образом, улучшенное связывание с клеткой-мишенью или улучшение специфичности направленного воздействия вектора на

конкретную клеточную популяцию. Пример может включать применение RGD пептида для блокирования захвата пигментным эпителием сетчатки и, таким образом, усиления трансдукции окружающих тканей сетчатки (Cronin et al. (2008) ARVO Abstract: D1048). Неродственный белок также может быть белком, который облегчает очистку вирусной частицы в качестве части процесса получения, т.е. эпитопом или аффинной меткой. Сайт введения, как правило, выбирают таким образом, чтобы он не препятствовал другим функциям вирусной частицы, т.е. интернализации, транспортировке вирусной частицы. Специалист может идентифицировать подходящие сайты вставки на основе своих общих знаний. Конкретные сайты раскрыты в публикации Choi et al., указанной выше, и в Dalkara et al. (Science, Translational Medicine, 2013; 5(189)).

Изобретение дополнительно охватывает предоставление последовательностей генома AAV в другом порядке и конфигурации, нежели в нативном геноме AAV. Изобретение также охватывает замену одной или больше последовательностей или генов AAV последовательностями другого вируса или химерными генами, состоящими из последовательностей больше чем одного вируса. Такие химерные гены могут состоять из последовательностей двух или больше родственных вирусных белков из вирусов разных видов.

Вектор AAV согласно изобретению может иметь форму нуклеотидной последовательности, включающей геном AAV или его производное, и последовательность, кодирующую трансгены молекулы против VEGF и негативного регулятора комплемента или их производные.

Частицы AAV согласно изобретению включают транскapsидированные формы, в которых геном или производное AAV, имеющие ITR из одного серотипа, упакованы в капсид другого серотипа. Частицы AAV согласно изобретению также включают мозаичные формы, в которых вирусный капсид состоит из смеси немодифицированных капсидных белков из двух или больше разных серотипов. Частица AAV также включает химически модифицированные формы, несущие лиганды, адсорбированные на поверхности капсида. Например, такие лиганды могут включать антитела для направленного взаимодействия с конкретным рецептором клеточной поверхности.

Так, например, частицы AAV согласно изобретению включают частицы AAV с геномом AAV2 и капсидными белками AAV2 (AAV2/2), частицы AAV с геномом AAV2 и капсидными белками AAV5 (AAV2/5) и частицы AAV с геномом AAV2 и капсидными белками AAV8 (AAV2/8), а также частицы AAV с геномом AAV2 и капсидными белками больше чем одного серотипа.

Вектор AAV может включать множество копий (например, 2, 3 и т.д.) нуклеотидной последовательности, указанной в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид дополнительно включает один или больше ITR AAV. В предпочтительных вариантах осуществления полинуклеотид дополнительно включает два ITR AAV. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид включает ITR AAV на 5'-конце и ITR AAV на 3'-конце. В

некоторых вариантах осуществления ITR AAV представляют собой ITR AAV2 или AAV8. В предпочтительных вариантах осуществления ITR AAV представляют собой ITR AAV2.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид включает 5' ITR AAV с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 55 или нуклеотидной последовательностью, обладающей по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с ней.

```
CGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACSTTTG
GTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGGGAGTGGCCAACSTCCATC
ACTAGGGGTTTCCT
```

SEQ ID NO: 55

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид дополнительно включает нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 56 или нуклеотидную последовательность, обладающую по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с ней, непосредственно примыкающую к 3'-концу 5'-ITR.

```
TGTAGTTAATGATTAACCCGCCATGCTACTTATCTACGTAGCCATGCTCTAGG
TACC
```

SEQ ID NO: 56

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид включает 5'-ITR AAV с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 65 или нуклеотидной последовательностью, обладающей по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с ней.

```
aggaaccctagtgatggagtggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgcccgggcaaagccccggggcgt
cgggcgacctttggtcgcccgccctcagtgagcgcgagcgcgcagagaggagtgccaa
```

SEQ ID NO: 65

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид включает 3'-ITR AAV с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 57 или нуклеотидной последовательностью, обладающей по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с ней.

```
AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTC
ACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTC
AGTGAGCGAGCG
```

SEQ ID NO: 57

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид дополнительно включает нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 58 или нуклеотидную последовательность, обладающую по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью

последовательности с ней, непосредственно примыкающую к 5'-концу 3'-ITR.

СТТСТGAGGCGGAAAGAACCAGCTGGGGCTCGACTAGAGCATGGCTACGTAG
ATAAGTAGCATGGCGGGTTAATCATТААСТАСА

SEQ ID NO: 58

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид включает 3'-ITR AAV с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 66 или нуклеотидной последовательностью, обладающей по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с ней.

aggaaccctagtgatggagtggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgggcgaccaaaaggctgccccga
cgccccgggctttgccccgggcgccctcagtgagcgagcgagcgcgagagaggagtgggccaa

SEQ ID NO: 66

Промоторы и регуляторные последовательности

Полинуклеотид или вектор согласно изобретению также могут включать элементы, обеспечивающие экспрессию трансгенов молекулы против VEGF и/или негативного регулятора комплемента *in vitro* или *in vivo*. Они могут называться последовательностями регуляции экспрессии. Таким образом, полинуклеотид или вектор, как правило, включают последовательности регуляции экспрессии (например, включающие промоторную последовательность), функционально связанные с нуклеотидной последовательностью, кодирующей трансген.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид или вектор включает нуклеотидные последовательности, кодирующие: (a) промотор ЦМВ или промотор CAG, необязательно, где ЦМВ или CAG промотор расположен перед нуклеотидными последовательностями, кодирующими молекулу против VEGF и/или негативный регулятор комплемента; (b) регуляторный элемент WPRE, необязательно, где регуляторный элемент WPRE расположен после нуклеотидных последовательностей, кодирующих молекулу против VEGF и/или негативный регулятор комплемента; и/или (c) поли-А сигнал, такой как поли-А сигнал бычьего гормона роста, необязательно, где поли-А сигнал расположен после нуклеотидных последовательностей, кодирующих молекулу против VEGF и/или негативный регулятор комплемента.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид или вектор включает:

- (a) 5'-ITR AAV;
- (b) промотор, необязательно промотор ЦМВ;
- (c) нуклеотидную последовательность, кодирующую негативный регулятор комплемента;
- (d) линкер, необязательно, где линкер включает или определен последовательностью сайта расщепления фурина, GSG, 11a1D и F2A;
- (e) нуклеотидную последовательность, кодирующую молекулу против VEGF, предпочтительно афлиберцепт;
- (f) необязательно, регуляторный элемент WPRE, необязательно регуляторный

элемент WPRE3;

- (g) поли-А сигнал, необязательно поли-А сигнал бычьего гормона роста; и
- (h) 3'-ITR AAV.

Негативный регулятор комплемента может быть выбран из CFI и FHL-1.

Элементы (с) и (е) можно менять местами.

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления полинуклеотид или вектор включает:

- (a) 5'-ITR AAV;
- (b) промотор, необязательно промотор ЦМВ;
- (c) нуклеотидную последовательность, кодирующую молекулу против VEGF, предпочтительно афлиберцепт;
- (d) линкер, необязательно, где линкер включает или определен последовательностью сайта расщепления фурина, GSG, 11a1D и F2A;
- (e) нуклеотидную последовательность, кодирующую негативный регулятор комплемента;
- (f) необязательно, регуляторный элемент WPRE, необязательно регуляторный элемент WPRE3;

- (g) поли-А сигнал, необязательно поли-А сигнал бычьего гормона роста; и
- (h) 3'-ITR AAV.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид или вектор включает:

- (a) 5'-ITR AAV;
- (b) промотор, необязательно промотор CAG;
- (c) нуклеотидную последовательность, кодирующую негативный регулятор комплемента, предпочтительно FHL-1;
- (d) линкер, необязательно, где линкер включает или определен последовательностью сайта расщепления фурина, GSG, 11a1D и F2A;
- (e) нуклеотидную последовательность, кодирующую молекулу против VEGF, предпочтительно афлиберцепт;
- (f) необязательно, регуляторный элемент WPRE, также необязательно регуляторный элемент WPRE3;

- (g) поли-А сигнал, необязательно поли-А сигнал бычьего гормона роста; и
- (h) 3'-ITR AAV.

Элементы (с) и (е) можно менять местами.

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления полинуклеотид или вектор включает:

- (a) 5'-ITR AAV;
- (b) промотор, необязательно промотор CAG;
- (c) нуклеотидную последовательность, кодирующую молекулу против VEGF, предпочтительно афлиберцепт;
- (d) линкер, необязательно, где линкер включает или определен

последовательностью сайта расщепления фурина, GSG, 11a1D и F2A;

(e) нуклеотидную последовательность, кодирующую негативный регулятор комплемента, предпочтительно FHL-1;

(f) необязательно, регуляторный элемент WPRE, также необязательно регуляторный элемент WPRE3;

(g) поли-А сигнал, необязательно поли-А сигнал бычьего гормона роста; и

(h) 3'-ITR AAV.

Полинуклеотид может включать (a)-(h) в порядке от 5' к 3'. Предпочтительно (a) расположен на 5'-конце полинуклеотида, и (h) расположен на 3'-конце полинуклеотида. Предпочтительно (b) расположен перед (c)-(g). Предпочтительно (f) расположен после (b)-(e). Предпочтительно (g) расположен после (b)-(f). Предпочтительно (c) расположен перед (d), и (e) расположен после (d).

Может использоваться любой подходящий промотор, выбор которого может быть легко сделан специалистом в данной области. Промоторная последовательность может быть конститутивно активной (т.е. функциональной в любом окружении клетки-хозяина) или, в альтернативе, может быть активной только в специфическом окружении клетки-хозяина, что позволяет вести направленную экспрессию трансгена в клетках конкретного типа (например, тканеспецифический промотор). Промотор может демонстрировать индуцируемую экспрессию в ответ на присутствие другого фактора, например, фактора, присутствующего в клетке-хозяине. В любом случае, когда вектор вводят для терапии, то промотор предпочтительно должен быть функциональным в окружении клетки-мишени.

В некоторых вариантах осуществления предпочтительно, чтобы промотор демонстрировал специфическую экспрессию в клетках сетчатки, что позволит трансгену экспрессироваться только в популяциях клеток сетчатки. Таким образом, экспрессия промотора может быть специфической для клеток сетчатки, например, ограниченной только клетками нейросенсорной сетчатки и пигментного эпителия сетчатки. Промотор также может обеспечивать экспрессию, в частности ткане- или клеточно-специфическую экспрессию, в ганглионарных клетках, клетках Мюллера, фоторецепторных клетках, клетках пигментного эпителия сетчатки и/или эндотелиальных клетках.

Предпочтительные промоторы, которые не являются специфическими для клеток сетчатки, включают промотор бета-актина курицы (CBA), необязательно в комбинации с энхансерным элементом цитомегаловируса (ЦМВ). Примером промотора для применения в изобретении является промотор CAG, например, промотор, применяемый в каскаде экспрессии rAVE (GeneDetect.com).

В предпочтительных вариантах осуществления полинуклеотид или вектор включает промотор ЦМВ.

Примером последовательности промотора ЦМВ является:

```
GGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCC
AACGACCCCGCCCATTTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATA
GGGACTTTCCATTTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCA
```

GTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAA
 TGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAG
 TACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGTATGCGGTTTTGGCAGTACATC
 AATGGGCGTGGATAGCGGTTTGA CTACG GGGATTTC CAAGTCTCCACCCCATTGAC
 GTCAATGGGAGTTTTGTTTTGGCACCAAATCAACGGGACTTTCCAAATGTCGTAAC
 AACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATAT
 AAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTT
 TGACCTCCATAGAAGACACCG

(SEQ ID NO: 59)

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид или вектор включает промотор с нуклеотидной последовательностью, обладающей по меньшей мере 75%, 80%, 85% 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с SEQ ID NO: 59. Предпочтительно, где нуклеотидная последовательность по существу сохраняет функциональную активность промотора, представленного SEQ ID NO: 59.

В других вариантах осуществления полинуклеотид или вектор включает промотор с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 60.

Примером последовательности промотора CAG является:

CCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTT
 CCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCA
 AGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGC
 CTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTA
 CGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTC
 CCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTTTAATTTTGT
 TGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGG
 GGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCG
 GCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGGCGGCCCTATAAA
 AAGCGAAGCGCGCGGCGGGGCGGGAGTCGCTGCGCGCTGCCTTCGCCCCGTGCCCG
 CTCCGCGCCGCGCTCGCGCCGCCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGTACTCCCACA
 GGTGAGCGGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTTAATG
 ACGGCTTGTCTTTCTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTGAGGGGCTCCGGGAGGGCCC
 TTTGTGCGGGGGGAGCGGCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGGACGGCTGCCTTCGGGGG
 GGACGGGGCAGGGCGGGGTTCCGGCTTCTGGCGTGTGACCGGCGGCTCTAGAGCCTC
 TGCTAACCATGTTTCATGCCTTCTTCTTTTTTCTACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTT
 ATTGTGCTGTCTCATCATTTTGGCAAAGAATTGGATCC (SEQ HOMER ID: 60)

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид или вектор включает промотор с нуклеотидной последовательностью, обладающей по меньшей мере 75%, 80%, 85% 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с SEQ ID NO: 60. Предпочтительно, где нуклеотидная последовательность по существу сохраняет функциональную активность промотора, представленного SEQ ID NO: 60.

В других вариантах осуществления полинуклеотид или вектор включает промотор

с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 60.

Примеры промоторов на основе человеческих последовательностей, которые могут индуцировать экспрессию генов, специфических для сетчатки, включают родопсинкиназу палочек и колбочек (Allocca et al. (2007) *J. Virol.* 81: 11372-80), PR2.1 только для колбочек (Mancuso et al. (2009) *Nature* 461: 784-7) и/или RPE65 (Bainbridge et al. (2008) *N. Engl. J. Med.* 358: 2231-9) или VMD2 (Esumi et al. (2004) *J. Biol. Chem.* 279: 19064-73) для пигментного эпителия сетчатки.

Полинуклеотид или вектор согласно изобретению также может включать одну или больше дополнительных регуляторных последовательностей, которые могут действовать до или после транскрипции. Регуляторная последовательность может быть частью локуса нативного трансгена или может быть гетерологичной регуляторной последовательностью. Полинуклеотид или вектор согласно изобретению может включать фрагменты 5'-UTR или 3'-UTR из транскрипта нативного трансгена.

Регуляторные последовательности представляют собой любые последовательности, которые облегчают экспрессию трансгена, т.е. обеспечивают повышение экспрессии транскрипта, улучшение экспорта мРНК в ядро или повышение ее стабильности. Такие регуляторные последовательности включают, например, энхансерные элементы, посттранскрипционные регуляторные элементы и сайты полиаденилирования.

Предпочтительным сайтом полиаденилирования является поли-А сигнал бычьего гормона роста (bGH поли-А).

Примером поли-А сигнала бычьего гормона роста (bGH поли-А) является:

```
GTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTG
ACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCG
CATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAA
GGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGG
(SEQ ID NO: 61)
```

Другим примером поли-А сигнала бычьего гормона роста (bGH поли-А) является:

```
TCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCC
CCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTTCCTAATA
AAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGG
GGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGG
GATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTGGGG
(SEQ ID NO: 62)
```

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид или вектор включает сигнал полиаденилирования с нуклеотидной последовательностью, обладающей по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с SEQ ID NO: 61 или 62. Предпочтительно, где нуклеотидная последовательность по существу сохраняет функциональную активность сигнала полиаденилирования, представленного SEQ ID NO: 61 или 62.

В других вариантах осуществления полинуклеотид или вектор включает сигнал полиаденилирования с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 61 или 62.

В контексте полинуклеотида или вектора согласно изобретению такие регуляторные последовательности будут активными в цис-положении. Однако изобретение также охватывает применение регуляторных последовательностей, действующих в транс-положении, расположенных на дополнительных генетических конструкциях.

Предпочтительным посттранскрипционным регуляторным элементом для применения в векторе AAV согласно изобретению является посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита лесного сурка (WPRE) или его вариант.

Примером WPRE является:

ATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTAT
GTTGCTCSTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTG
CTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTAT
GAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGCTGAC
GCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTC
GCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCT
GGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATCCGTGGTGTGTCGGGGAAATCA
TCGTCSTTTCCTTGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCCT
TCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCTTCCCGCGGCCTGCTGCC
GGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTT
TGGGCCGCCTCCCCGC

(SEQ ID NO: 63)

WPRE представляет собой трехкомпонентный элемент, содержащий гамма, альфа и бета-элементы, в данном порядке. Укороченный вариант WPRE, содержащий только минимальные гамма и альфа-элементы (называемый WPRE3; Choi, J.-H. et al. (2014) *Molecular Brain* 7: 17), также может применяться в изобретении.

Примером последовательности WPRE3 является:

AATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTA
TGTTGCTCSTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATT
GCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTAGTTCTTGCCAC
GGCGGAACATCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGG
CACTGACAATCCGTGGT

(SEQ ID NO: 64)

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид или вектор включает посттранскрипционный регуляторный элемент с нуклеотидной последовательностью, обладающей по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с SEQ ID NO: 63 или 64. Предпочтительно, где нуклеотидная последовательность по существу сохраняет функциональную активность посттранскрипционного регуляторного элемента, представленного SEQ ID NO: 63 или 64.

WPRE может быть получен из последовательности посттранскрипционного регуляторного элемента (WPRE) природного или модифицированного вируса гепатита лесного сурка.

В других вариантах осуществления полинуклеотид или вектор включает посттранскрипционный регуляторный элемент с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 63 или 64.

Еще одной регуляторной последовательностью, которая может использоваться в полинуклеотиде или векторе согласно изобретению, является область прикрепления к ядерному матриксу (SAR). Дополнительные регуляторные последовательности могут быть легко выбраны специалистом в данной области.

Способ введения

Продукты, полинуклеотид или вектор согласно изобретению можно вводить системно (например, путем инфузии в периферическую вену) и можно вводить местно или регионарно (например, в систему ЦНС путем интратекальной инъекции). В предпочтительных вариантах осуществления продукт, полинуклеотид или вектор вводят внутриглазным путем.

Термин "внутриглазной" относится к внутренней части глаза, таким образом, внутриглазное введение относится к введению внутрь глаза субъекта.

В некоторых вариантах осуществления продукт, полинуклеотид или вектор вводят в глаз субъекта путем субретинальной, прямой ретинальной, супрахориоидальной или интравитреальной инъекции. В некоторых вариантах осуществления указанное введение выполняет робот.

Объем вводимой лекарственной композиции может составлять, например, приблизительно 10-500 мкл, например, приблизительно 50-500, 100-500, 200-500, 300-500, 400-500, 50-250, 100-250, 200-250 или 50-150 мкл. Объем может составлять, например, приблизительно 10, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 или 500 мкл. Предпочтительно объем вводимой лекарственной композиции составляет 100 мкл.

Квалифицированный специалист будет знаком с индивидуальными субретинальными, прямыми ретинальными, супрахориоидальными или интравитреальными инъекциями и сумеет их выполнять.

Продукт, полинуклеотид или вектор предпочтительно вводят путем субретинальной инъекции.

В некоторых вариантах осуществления продукт, полинуклеотид, вектор или фармацевтическую композицию, включающую их, вводят не больше чем один раз или не больше чем два раза в течение жизни субъекта.

Субретинальная инъекция

Субретинальные инъекции - это инъекции в субретинальное пространство, то есть под нейросенсорную сетчатку. Во время субретинальной инъекции вводимый материал направляется внутрь и создает пространство между слоями фоторецепторных клеток и пигментного эпителия сетчатки (ПЭС).

При проведении инъекции через малое отверстие во время ретиномии может возникать отслоение сетчатки. Отслоившийся приподнятый слой сетчатки, который образован введенным материалом, называется "подушкой".

Отверстие, создаваемое при субретинальной инъекции, должно быть достаточно маленьким, чтобы вводимый раствор не перетекал обратно в полость стекловидного тела после введения. Такой обратный поток будет особенно проблематичным при введении лекарственного средства, поскольку действие лекарственного средства будет направлено в сторону от целевой зоны. Предпочтительно инъекция создает samozапечатающуюся точку введения в нейросенсорной сетчатке, т.е. после удаления инъекционной иглы отверстие, созданное иглой, снова закрывается, в результате чего через отверстие выходит очень мало или практически не выходит вводимый материал.

Для облегчения этого процесса в продаже имеются специальные иглы для субретинальных инъекций (например, игла для субретинальных инъекций с тефлоновым покрытием DORC 41G, Dutch Ophthalmic Research Center International BV, Zuidland, The Netherlands). Это иглы, предназначенные для проведения субретинальных инъекций.

Если во время инъекции не происходит повреждения сетчатки, и пока используется достаточно тонкая игла, практически весь введенный материал остается локализованным между отслоившейся нейросенсорной сетчаткой и ПЭС в месте локализованной отслойки сетчатки (т.е. не перетекает в стекловидное тело). Фактически типичное устойчивое сохранение подушки в течение короткого периода времени указывает на то, что введенный материал обычно не попадает в стекловидное тело. Подушка может рассасываться в течение более длительного периода времени по мере всасывания введенного материала.

Визуализация глаза, в частности сетчатки, например, с помощью оптической когерентной томографии, может быть выполнена до операции.

Объем вводимой лекарственной композиции может составлять, например, приблизительно 10-500 мкл, например, приблизительно 50-500, 100-500, 200-500, 300-500, 400-500, 50-250, 100-250, 200-250 или 50-150 мкл. Объем может составлять, например, приблизительно 10, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 или 500 мкл. Предпочтительно объем вводимой лекарственной композиции составляет 100 мкл. Большие объемы могут повышать риск растяжения сетчатки, тогда как меньшие объемы могут быть малозаметными.

Двухэтапная субретинальная инъекция

Продукт, полинуклеотид или вектор согласно настоящему изобретению можно доставлять с повышенной точностью и безопасностью с применением двухэтапного способа, в котором локализованное отслоение сетчатки создается при субретинальной инъекции первого раствора. Первый раствор не включает продукт, полинуклеотид или вектор. Затем вторую субретинальную инъекцию применяют для доставки лекарственного средства, включающего продукт, полинуклеотид или вектор, в субретинальную жидкость подушки, созданной первой субретинальной инъекцией. Поскольку инъекция,

доставляющая лекарственное средство, не используется для отслоения сетчатки, в этом втором этапе можно вводить определенный объем раствора.

В некоторых вариантах осуществления субретинальная инъекция вектора включает следующие этапы:

(а) введение раствора субъекту путем субретинальной инъекции в количестве, эффективном, по меньшей мере, для частичного отслоения сетчатки с образованием субретинальной подушки, при этом раствор не включает продукт, полинуклеотид или вектор; а также

(б) введение лекарственной композиции путем субретинальной инъекции в подушку, сформированную в этапе (а), где лекарственное средство включает продукт, полинуклеотид или вектор.

Объем раствора, вводимого в этапе (а), по меньшей мере, для частичного отслоения сетчатки, может составлять, например, приблизительно 10-1000 мкл, например, приблизительно 50-1000, 100-1000, 250-1000, 500-1000, 10-500, 50-500, 100-500, 250-500 мкл. Объем может составлять, например, приблизительно 10, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 или 1000 мкл.

Объем лекарственной композиции, вводимой на этапе (б), может составлять, например, приблизительно 10-500 мкл, например, приблизительно 50-500, 100-500, 200-500, 300-500, 400-500, 50-250, 100-250, 200-250 или 50-150 мкл. Объем может составлять, например, приблизительно 10, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 или 500 мкл. Предпочтительно объем лекарственной композиции, вводимой на стадии (б), составляет 100 мкл. Большие объемы могут повышать риск растяжения сетчатки, тогда как меньшие объемы могут быть малозаметными.

Раствор, который не включает лекарственное средство (т.е. "раствор" на этапе (а)) может быть приготовлен аналогично раствору, который включает лекарственное средство, как описано ниже. Предпочтительным раствором, не включающим лекарственное средство, является сбалансированный физиологический раствор (BSS) или аналогичный буферный раствор, соответствующий по показателям pH и осмоляльности субретинальному пространству.

Визуализация сетчатки во время операции

При некоторых обстоятельствах, например, при конечной стадии дегенерации сетчатки, идентификация сетчатки сложна, поскольку она становится тонкой, прозрачной и ее трудно увидеть на фоне разрушенного и сильно пигментированного эпителия, на котором она расположена. Применение синего витального красителя (например, Brilliant Peel[®], Geuder; MembraneBlue-Dual[®], Dorc) может облегчить идентификацию отверстия в сетчатке, сделанного для процедуры отслоения сетчатки (т.е. этапа (а) в двухэтапном способе субретинальной инъекции согласно изобретению), чтобы лекарственное средство можно было ввести через это отверстие без риска рефлюкса обратно в полость стекловидного тела.

Применение синего витального красителя также позволяет идентифицировать

любые области сетчатки, в которых утолщена внутренняя пограничная мембрана или эпиретинальная мембрана, поскольку инъекция через любую из этих структур будет затруднять чистый доступ в субретинальное пространство. Кроме того, натяжение любой из этих структур непосредственно в послеоперационном периоде может привести к растяжению входного отверстия в сетчатке, что может привести к рефлюксу лекарственного средства в полость стекловидного тела.

Супрахориоидальная инъекция

Продукт, полинуклеотид или вектор согласно изобретению могут доставлять в супрахориоидальное пространство с использованием доступа *ab externo*, в котором используется микрокатетер (см., например, Peden et al. (2011) PLoS One 6(2): e17140). В этом методе выполняют лимбальную конъюнктивальную перитомию для обнажения склеры с последующей склеротомией для обнажения сосудистой оболочки. Микрокатетер (такой как iTrack 250A производства iScience Interventional, необязательно подключенный к системе освещения, такой как система микроосвещения на основе лазерных диодов iLumin (iScience Interventional)) вводят в супрахориоидальное пространство и продвигают кзади в направлении диска зрительного нерва. После манипулирования наконечником микрокатетера с установкой в нужное положение, инъекция продукта, полинуклеотида или вектора приводит к образованию подушки в сетчатке и сосудистой оболочке глаза.

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления продукт, полинуклеотид или вектор доставляют супрахориоидально с помощью способа, включающего: (i) введение микрокатетера в супрахориоидальное пространство; (ii) продвижение микрокатетера в указанном пространстве до тех пор, пока кончик не окажется вблизи пораженной области сетчатки; и (iii) введение продукта, полинуклеотида или вектора через наконечник микрокатетера с формированием подушки.

В некоторых вариантах осуществления описанные выше процедуры введения непосредственно выполняются роботом.

Фармацевтические композиции и растворы для инъекций

Лекарственные средства, например, продукты, полинуклеотиды или векторы согласно изобретению, могут быть включены в состав фармацевтических композиций. Такие композиции могут включать в дополнение к лекарственному средству фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель, вспомогательное вещество, буфер, стабилизатор или другие материалы, хорошо известные в данной области. Такие материалы должны быть нетоксичными и не должны влиять на эффективность активного ингредиента. Точная природа носителя или другого материала может быть определена специалистом в данной области в зависимости от пути введения, т.е. субретинальной, прямой ретинальной, супрахориоидальной или интравитреальной инъекции.

Фармацевтическая композиция обычно находится в жидкой форме. Жидкие фармацевтические композиции обычно включают жидкий носитель, такой как воду, вазелиновое масло, животные или растительные масла, минеральное масло или синтетическое масло. Может быть включен физиологический раствор, хлорид магния,

раствор декстрозы или другого сахара, или гликоли, такие как этиленгликоль, пропиленгликоль или полиэтиленгликоль. В некоторых случаях может использоваться поверхностно-активное вещество, такое как плуроновая кислота (PF68) 0,001%.

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

Для задержки высвобождения лекарственное средство может быть включено в фармацевтическую композицию, изготовленную для медленного высвобождения, например, в виде микрокапсул из биосовместимых полимеров или в липосомальных системах-носителях в соответствии со способами, известными в уровне техники.

Способ лечения

Следует понимать, что все ссылки на лечение в настоящем документе включают радикальное, паллиативное и профилактическое лечение; хотя в контексте изобретения ссылки на предупреждение чаще всего ассоциируются с профилактическим лечением. Лечение также может включать остановку прогрессирования тяжести заболевания.

Предпочтительно лечение млекопитающих, в особенности человека. Впрочем, в объем изобретения одновременно входит лечение и человека, и животных.

Термин "комбинация" или термины "в комбинации", "применяемый в комбинации с" или "комбинированный препарат", используемые в настоящем документе, могут относиться к комбинированному введению двух или более средств одновременно, последовательно или по отдельности.

Термин "одновременный" при использовании в настоящем документе означает, что средства вводят одновременно, т.е. в одно и то же время.

Термин "последовательный" при использовании в настоящем документе означает, что средства вводят подряд, одно за другим.

Термин "раздельный" при использовании в настоящем документе означает, что средства вводят независимо друг от друга, но в рамках временного интервала, который позволяет средства производить комбинированный, предпочтительно синергический эффект. Таким образом, введение "отдельно" может позволять вводить одно средство, например, в течение 1 минуты, 5 минут или 10 минут после другого.

Варианты, производные, аналоги, гомологи и фрагменты

В дополнение к конкретным белкам и нуклеотидам, указанным в настоящем документе, изобретение также охватывает применение их вариантов, производных, аналогов, гомологов и фрагментов.

В рамках изобретения вариант той или иной последовательности представляет собой последовательность, в которой конкретная последовательность остатков (будь то

остатки аминокислот или нуклеиновых кислот) была модифицирована таким образом, что рассматриваемый полипептид или полинуклеотид по существу сохраняет свою функцию. Вариант последовательности может быть получен в результате добавления, делеции, замены, модификации, замещения и/или изменения по меньшей мере одного остатка, присутствующего в природном белке.

Термин "производное" при использовании в настоящем документе в отношении белков или полипептидов согласно изобретению включает любую замену, изменение, модификацию, замещение, делецию и/или добавление одного (или больше) аминокислотного остатка из последовательности или в последовательность, в результате чего полученный белок или полипептид по существу сохраняет по меньшей мере одну из своих эндогенных функций.

Термин "аналог" при использовании в настоящем документе в отношении полипептидов или полинуклеотидов включает любой миметик, то есть химическое соединение, которые обладает по меньшей мере одной из эндогенных функций полипептидов или полинуклеотидов, которые оно имитирует.

Как правило, аминокислотные замены, например, от 1, 2 или 3 до 10 или 20 замен, могут быть сделаны при условии, что модифицированная последовательность по существу сохраняет требуемую активность или способность. Аминокислотные замены могут включать применение неприродных аналогов.

Белки, применяемые в изобретении, также могут иметь делеции, вставки или замены аминокислотных остатков, которые дают молчащее изменение и приводят к функционально эквивалентному белку. Преднамеренные аминокислотные замены могут быть сделаны на основе сходства полярности, заряда, растворимости, гидрофобности, гидрофильности и/или амфипатической природы остатков, при условии сохранения эндогенной функции. Например, отрицательно заряженные аминокислоты включают аспарагиновую кислоту и глутаминовую кислоту; положительно заряженные аминокислоты включают лизин и аргинин; и аминокислоты с незаряженными полярными концевыми группами, имеющие сходные значения гидрофильности, включают аспарагин, глутамин, серин, треонин и тирозин.

Консервативные замены, например, могут быть сделаны в соответствии с таблицей ниже. Аминокислоты в одном и том же блоке во второй колонке и предпочтительно в одной строке в третьем колонке могут быть заменены друг другом:

АЛИФАТИЧЕСКИЕ	Неполярные	G A P I L V
	Полярные - незаряженные	C S T M N Q
	Полярные - заряженные	D E K R H
	АРОМАТИЧЕСКИЕ	F W Y

Термин "гомолог" при использовании в настоящем документе означает молекулу, обладающую некоторой гомологией с аминокислотной последовательностью дикого типа и нуклеотидной последовательностью дикого типа. Термин "гомология" может быть приравнен к "идентичности".

Гомологичная последовательность может включать аминокислотную последовательность, которая может быть по меньшей мере на 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% или 90% идентичной, предпочтительно по меньшей мере на 95% или 97%, или на 99% идентичной рассматриваемой последовательности. Как правило, гомологи будут включать такие же активные сайты и т.д., как и рассматриваемая аминокислотная последовательность. Хотя гомологию также можно рассматривать с точки зрения подобия (т.е. аминокислотных остатков, обладающих подобными химическими свойствами/функциями), в рамках изобретения предпочтительно выражать гомологию с точки зрения идентичности последовательности.

Гомологичная последовательность может включать нуклеотидную последовательность, которая может быть по меньшей мере на 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% или 90% идентичной, предпочтительно по меньшей мере на 95% или 97%, или на 99% идентичной рассматриваемой последовательности. Хотя гомологию также можно рассматривать с точки зрения подобия, в рамках изобретения предпочтительно выражать гомологию с точки зрения идентичности последовательности.

Предпочтительно ссылка на последовательность, которая обладает неким процентом идентичности по отношению к какой-либо из SEQ ID NO, представленной в настоящем документе, относится к последовательности, которая обладает указанным процентом идентичности по всей протяженности указанной SEQ ID NO.

Сравнение гомологии можно проводить визуально или, как правило, с помощью легкодоступных программ сравнения последовательностей. Эти коммерчески доступные компьютерные программы могут вычислять процент гомологии или идентичности между двумя или больше последовательностями.

Процент гомологии может быть вычислен для непрерывных последовательностей, т.е. одну последовательность выравнивают с другой последовательностью, и каждую аминокислоту в одной последовательности непосредственно сравнивают с соответствующей аминокислотой в другой последовательности, по одному остатку каждый раз. Это называется выравниванием без пропусков. Как правило, такие выравнивания без пропусков выполняют только с относительно небольшим числом остатков.

Хотя это очень простой и надежный метод, он не позволяет учитывать такой случай, когда, например, в идентичной паре последовательностей одна вставка или делеция в нуклеотидной последовательности может вывести следующие кодоны из выравнивания, что потенциально может приводить к значительному снижению процента гомологии при выполнении глобального выравнивания. Следовательно, большинство методов сравнения последовательностей предназначены для получения оптимального

выравнивания, которое учитывает возможные вставки и делеции, без чрезмерного снижения общей оценки гомологии. Это достигается путем вставки "пропусков" в выравнивание последовательностей, чтобы попытаться получить максимальное значение локальной гомологии.

Впрочем, эти более сложные методы вводят "штрафы за пропуск" для каждого пропуска, который появляется при выравнивании, при этом в случае одинакового количества идентичных аминокислот выравнивание последовательности с наименьшим возможным количеством пропусков, отражающим более высокое родство между двумя сравниваемыми последовательностями, получит более высокий балл, чем выравнивание, в котором присутствует много пропусков. Обычно используют "штрафы за продолжение пропуска", которые включают относительно высокий штраф за существование пропуска и меньший штраф за каждый последующий остаток в пропуске. Это наиболее часто используемая система оценки пропусков. Высокие штрафы за пропуски, конечно, приведут к оптимизированному выравниванию с меньшим количеством пропусков. Большинство программ для выравнивания позволяют изменять штрафы за пропуски. Однако при использовании таких программ для сравнения последовательностей предпочтительно использовать значения по умолчанию. Например, при использовании пакета GCG Wisconsin Bestfit штраф за пропуск по умолчанию для аминокислотных последовательностей составляет -12 за пропуск и -4 за каждое продолжение.

Таким образом, вычисление максимального процента гомологии, во-первых, требует получения оптимального выравнивания с учетом штрафов за пропуски. Подходящей компьютерной программой для проведения такого выравнивания является пакет GCG Wisconsin Bestfit (University of Wisconsin, U.S.A.; Devereux et al. (1984) *Nucleic Acids Res.* 12: 387). Примеры других программ, которые могут выполнять сравнение последовательностей, включают, помимо прочего, пакет BLAST (см. Ausubel et al. (1999), там же, - Гл. 18), FASTA (Atschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 403-410) и набор инструментов сравнения GENEWORKS. И BLAST, и FASTA доступны для автономного и онлайн-поиска (см. Ausubel et al. (1999), там же, страницы с 7-58 по 7-60). Однако для некоторых применений предпочтительнее использовать программу GCG Bestfit. Другой инструмент, называемый BLAST 2 Sequences, также доступен для сравнения белковых и нуклеотидных последовательностей (см. FEMS Microbiol. Lett. (1999) 174: 247-50; FEMS Microbiol. Lett. (1999) 177: 187-8).

Хотя окончательный процент гомологии можно измерить с точки зрения идентичности, сам процесс выравнивания обычно не основан на парном сравнении по принципу "все или ничего". Вместо этого обычно используют весовую матрицу оценок подобия, которая присваивает оценки каждому парному сравнению на основе химического подобия или эволюционного расстояния. Примером такой широко используемой матрицы является матрица BLOSUM62 - матрица по умолчанию для пакета программ BLAST. Программы GCG Wisconsin обычно используют общедоступные значения по умолчанию или пользовательскую таблицу сравнения символов, если она

предоставлена (дополнительную информацию см. в руководстве пользователя). Для некоторых применений предпочтительно использовать общедоступные значения по умолчанию для пакета GCG или, в случае другой программы, матрицу по умолчанию, такую как BLOSUM62.

После того как программа выполнила оптимальное выравнивание, можно вычислить процент гомологии, предпочтительно процент идентичности последовательностей. Программа обычно выполняет это в качестве части сравнения последовательностей и генерирует числовой результат.

"Фрагменты" также являются вариантами, при этом данный термин обычно относится к выбранной области полипептида или полинуклеотида, которая представляет интерес либо функционально, либо, например, в анализе. Таким образом, "фрагмент" относится к аминокислотной последовательности или последовательности нуклеиновой кислоты, которая является частью полноразмерного полипептида или полинуклеотида.

Такие варианты могут быть получены с использованием стандартных технологий рекомбинантных ДНК, таких как сайт-направленный мутагенез. Когда требуется сделать вставки, может быть получена синтетическая ДНК, кодирующая вставку вместе с 5'- и 3'-фланкирующими областями, соответствующими природной последовательности, по обе стороны от сайта вставки. Фланкирующие области будут содержать удобные сайты рестрикции, соответствующие сайтам в природной последовательности, чтобы такую последовательность можно было разрезать с помощью соответствующего фермента(ов) и лигировать синтетическую ДНК в разрез. Затем ДНК экспрессируют в соответствии с изобретением для получения кодируемого белка. Такие способы являются лишь иллюстрацией многочисленных стандартных методик, известных в данной области техники для манипуляции с последовательностями ДНК, при этом также могут использоваться другие известные методы.

Аспекты изобретения

Аспекты изобретения определены в следующих пронумерованных параграфах:

1. Продукт, включающий: (i) молекулу против VEGF; и (ii) негативный регулятор комплемента, или нуклеотидные последовательности, кодирующие их, в виде комбинированного препарата для одновременного, отдельного или последовательного применения в терапии.
2. Продукт для применения согласно параграфу 1, где заболевание, которое подлежит лечению или профилактике, является глазным нарушением.
3. Продукт для применения согласно параграфу 2, где глазное нарушение является комплемент-опосредованным глазным нарушением.
4. Продукт для применения согласно параграфу 3, где комплемент-опосредованным нарушением является возрастная макулодистрофия (ВМД), диабетическая ретинопатия, глаукома, болезнь Штаргардта, центральная серозная хориоретинопатия, пигментный ретинит, полипоидная хориоидальная васкулопатия, диабетический макулярный отек, окклюзия ветки вены сетчатки или увеит,

предпочтительно ВМД.

5. Продукт для применения согласно параграфу 4, где ВМД является влажной ВМД и/или сухой ВМД.

6. Продукт для применения согласно параграфу 4, где ВМД является влажной ВМД, и применение дополнительно предотвращает и/или лечит возникновение сухой ВМД у указанного субъекта.

7. Продукт для применения согласно любому из параграфов 1-6, где продукт включает полинуклеотид, включающий нуклеотидные последовательности, кодирующие: (i) молекулу против VEGF и (ii) негативный регулятор комплемента.

8. Выделенный полинуклеотид, включающий нуклеотидные последовательности, кодирующие: (i) молекулу против VEGF и (ii) негативный регулятор комплемента.

9. Продукт для применения согласно параграфу 7 или выделенный полинуклеотид согласно параграфу 8, где молекула против VEGF выбрана из Ig-слитого белка, антитела, полипептида, пептида, неиммуноглобулинового каркаса, антисмыслового олигонуклеотида, миРНК, мшРНК, гидовой цепи CRISPR и аптамера.

10. Продукт для применения или выделенный полинуклеотид согласно параграфу 9, где молекула против VEGF выбрана из афлиберцепта, ранибизумаба, бевацизумаба и пэгаптаниба.

11. Выделенный полинуклеотид согласно параграфу 10, где молекулой против VEGF является афлиберцепт, например, где афлиберцепт кодируется полинуклеотидной последовательностью, включающей любую из SEQ ID NO: 3-11.

12. Продукт для применения или выделенный полинуклеотид согласно любому предыдущему параграфу, где негативный регулятор комплемента выбран из фактора комплемента I (CFI), фактор комплемента H-подобного белка 1 (FHL1), фактора комплемента H (CFH), рецептора комплемента типа 1 (CR1), мембранного кофакторного белка (MCP), ускоряющего распад комплемента фактора (DAF), MAC-ингибиторного белка (MAC-IP), C1-ингибитора, ингибитор анафилатоксинов, C4b-связывающего белка (C4BP), кластерина, витронектина или их варианта или фрагмента.

13. Продукт для применения или выделенный полинуклеотид согласно параграфу 12, где негативный регулятор комплемента выбран из CFI и FHL1 или их варианта или фрагмента.

14. Продукт для применения или выделенный полинуклеотид согласно любому из параграфов 7-13, где полинуклеотид дополнительно включает нуклеотидные последовательности, кодирующие:

(a) ЦМВ или CAG промотор, необязательно, где ЦМВ или CAG промотор расположен перед нуклеотидными последовательностями, кодирующими (i) и (ii);

(b) регуляторный элемент WPRE, необязательно, где регуляторный элемент WPRE расположен после нуклеотидных последовательностей, кодирующих (i) и (ii); и/или

(c) поли-А сигнал, необязательно поли-А сигнал бычьего гормона роста, где полиА сигнал необязательно расположен после нуклеотидных последовательностей,

кодирующих (i) и (ii).

15. Продукт для применения или выделенный полинуклеотид согласно любому из параграфов 7-14, где полинуклеотид дополнительно включает один или больше инвертированных концевых повторов (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV).

16. Продукт для применения или выделенный полинуклеотид согласно любому из параграфов 7-15, где полинуклеотид включает ITR AAV на своем 5'-конце и ITR AAV на своем 3'-конце.

17. Продукт для применения или выделенный полинуклеотид согласно любому из параграфов 7-16, где полинуклеотид включает:

- (a) 5'-ITR AAV;
- (b) ЦМВ или CAG промотор;
- (c) нуклеотидную последовательность, кодирующую молекулу против VEGF;
- (d) линкер, где линкер необязательно включает или определен последовательностью сайта расщепления фурина, GSG, 11aa1D или последовательностью F2A;
- (e) нуклеотидную последовательность, кодирующую негативный регулятор комплемента;
- (f) необязательно, регуляторный элемент WPRE, где регуляторный элемент WPRE необязательно является регуляторным элементом WPRE3;
- (g) поли-А сигнал бычьего гормона роста; и
- (h) 3'-ITR AAV.

18. Продукт для применения или выделенный полинуклеотид согласно любому из параграфов 7-17, где ITR AAV представляют собой ITR AAV2.

19. Продукт для применения или выделенный полинуклеотид согласно любому из параграфов 7-18, где нуклеотидные последовательности, кодирующие молекулу против VEGF и негативный регулятор комплемента, является кодон-оптимизированными.

20. Продукт для применения или выделенный полинуклеотид согласно любому из параграфов 7-19, где нуклеотидная последовательность, кодирующая афлиберцепт, обладает по меньшей мере 75% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 11.

21. Продукт для применения или выделенный полинуклеотид согласно любому из параграфов 7-20, где нуклеотидная последовательность, кодирующая CFI, обладает по меньшей мере 75% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 35 или 36, или нуклеотидная последовательность, кодирующая FHL-1, обладает по меньшей мере 75% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 41.

22. Продукт для применения или выделенный полинуклеотид согласно любому из параграфов 7-20, где полинуклеотид включает нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 45-54 или нуклеотидную последовательность, обладающую по меньшей мере 75% идентичностью последовательности с ней.

23. Продукт для применения или выделенный полинуклеотид согласно любому из параграфов 7-22, где полинуклеотид меньше чем или равен 4,7 тн.

24. Вектор, включающий полинуклеотид согласно любому из параграфов 8-23.
25. Вектор согласно параграфу 24, где вектор является вектором на основе аденоассоциированного вируса (AAV).
26. Вектор согласно параграфу 24 или 25, где вектор находится в форме вирусной векторной частицы.
27. Вектор согласно параграфу 26, где векторная частица AAV включает геном AAV2 или AAV8, и капсидные белки AAV2 или AAV8.
28. Клетка, включающая полинуклеотид согласно любому из параграфов 7-22.
29. Клетка, трансдуцированная вектором согласно любому из параграфов 24-27.
30. Фармацевтическая композиция, включающая выделенный полинуклеотид, вектор или клетку согласно любому из параграфов 8-29 в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем, разбавителем или вспомогательным веществом.
31. Выделенный полинуклеотид, вектор или клетка согласно любому из параграфов 8-29 для применения в терапии.
32. Выделенный полинуклеотид, вектор или клетка согласно любому из параграфов 8-29 для применения при лечении или профилактике комплемент-опосредованного глазного нарушения.
33. Выделенный полинуклеотид, вектор или клетка для применения согласно параграфу 32, где комплемент-опосредованным нарушением являются возрастная макулодистрофия (ВМД), диабетическая ретинопатия, глаукома, болезнь Штаргардта, центральная серозная хориоретинопатия, пигментный ретинит, полипоидная хориоидальная васкулопатия, диабетический макулярный отек, окклюзия ветки вены сетчатки или увеит, предпочтительно ВМД.
34. Выделенный полинуклеотид, вектор или клетка для применения согласно параграфу 32, где ВМД является влажной ВМД и/или сухой ВМД.
35. Выделенный полинуклеотид, вектор или клетка для применения согласно параграфу 33, где ВМД является влажной ВМД, и применение дополнительно предотвращает и/или лечит возникновение сухой ВМД у указанного субъекта.
36. Полинуклеотид, вектор или клетка для применения согласно любому из параграфов 32-35, где формирование географической атрофии предотвращают или уменьшают, и/или уровень географической атрофии уменьшается.
37. Полинуклеотид, вектор или клетка для применения согласно любому из параграфов 32-36, где прогрессирование географической атрофии замедлено.
38. Полинуклеотид, вектор или клетка для применения согласно любому из параграфов 32-37, где в области географической атрофии присутствует по меньшей мере 10% снижение увеличения в течение 12 месяцев после введения в подвергнутом лечению глазу субъекта по сравнению с не подвергавшимся лечению глазу за тот же период.
39. Полинуклеотид, вектор или клетка для применения согласно любому из параграфов 32-38, где введение полинуклеотида, вектора или клетки повышает уровень C3b-инактивирующей и iC3b-расщепляющей активности у субъекта, или в глазу,

например в пигментном эпителии сетчатки (ПЭС), субъекта, необязательно до уровня, который превышает нормальный уровень у субъекта или в его глазу или ПЭС.

40. Полинуклеотид, вектор или клетка для применения согласно любому из параграфов 32-39, где полинуклеотид, вектор или клетку вводят внутриглазным путем.

41. Полинуклеотид, вектор или клетка для применения согласно любому из параграфов 32-40, где полинуклеотид, вектор или клетку вводят в глаз субъекта путем субретинальной, прямой ретинальной, супрахориоидальной или интравитреальной инъекции.

42. Полинуклеотид, вектор или клетка для применения согласно любому из параграфов 32-41, где полинуклеотид, вектор или клетку вводят в глаз субъекта путем субретинальной инъекции.

43. Способ лечения или предупреждения комплемент-опосредованного глазного нарушения, включающий введение выделенного полинуклеотида, вектора или клетки согласно любому из параграфов 8-29 нуждающемуся в этом субъекту.

44. Способ предоставления: (i) молекулы против VEGF; и (ii) негативного регулятора комплемента, субъекту, включающий доставку выделенного полинуклеотида, вектора или клетки согласно любому из параграфов 8-29 в глаз субъекта.

45. Молекула против VEGF для применения при лечении или профилактике заболевания, где молекулу против VEGF применяют в комбинации с негативным регулятором комплемента.

46. Негативный регулятор комплемента для применения при лечении или профилактике заболевания, где негативный регулятор комплемента применяют в комбинации с молекулой против VEGF.

47. Молекула против VEGF для применения согласно параграфу 45 или негативный регулятор комплемента для применения согласно параграфу 46, где заболевание является заболеванием, перечисленным в любом из параграфов 2-6.

48. Молекула против VEGF для применения согласно параграфу 45 или 47, где молекула против VEGF является молекулой, определенной в любом из параграфов 9-11.

49. Негативный регулятор комплемента для применения согласно параграфу 46 или 47, где негативный регулятор комплемента является молекулой, определенной в параграфе 12 или 13.

Специалисту в данной области техники будет понятно, что можно комбинировать все признаки изобретения, раскрытые в настоящем документе, без отступления от раскрытого объема изобретения.

Далее посредством неограничивающих примеров будут описаны предпочтительные признаки и варианты осуществления изобретения.

При практическом осуществлении настоящего изобретения будут использоваться, если не указано иное, стандартные методы химии, биохимии, молекулярной биологии, микробиологии и иммунологии, которые находятся в пределах возможностей специалиста в данной области. Такие методы описаны в литературе. См., например, Sambrook, J.,

Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel, F.M. et al. (1995 and periodic supplements) *Current Protocols in Molecular Biology*, Гл. 9, 13 и 16, John Wiley & Sons; Roe, B., Crabtree, J. and Kahn, A. (1996) *DNA Isolation and Sequencing: Essential Techniques*, John Wiley & Sons; Polak, J.M. and McGee, J.O'D. (1990) *In Situ Hybridization: Principles and Practice*, Oxford University Press; Gait, M.J. (1984) *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, IRL Press; и Lilley, D.M. and Dahlberg, J.E. (1992) *Methods in Enzymology: DNA Structures Part A: Synthesis and Physical Analysis of DNA*, Academic Press. Каждый из этих общих текстов включен в настоящий документ посредством отсылки.

ПРИМЕРЫ

Пример 1 - Оптимизация кодонов в последовательности афлиберцепта

Белковая последовательность афлиберцепта была изначально получена из www.drugbank.ca (см. SEQ ID NO: 1).

Белковую последовательность из 'Drugbank' использовали для обратной трансляции в последовательность ДНК, после чего выравнивали с белковой последовательностью человеческого рецептора VEGF и человеческого IgG и обозначали как последовательность Афлиберцепта 'дикого типа'. Последовательность ДНК афлиберцепта дикого типа получали и субклонировали в каркас GT005, обозначенный как RC288. Нативный сигнальный пептид FHL-1 добавляли перед последовательностью афлиберцепта дикого типа, чтобы обеспечить секрецию из клеток. Пять доступных онлайн инструментов использовали для генерирования "базовых" последовательностей (GeneArt, Genscript, Genewiz, IDT и JCat). Затем каждую из базовых последовательностей оптимизировали вручную, чтобы удалить криптические сайты сплайсинга, сайты связывания миРНК и тандемные дублированные кодоны. Такие оптимизированные последовательности были обозначены как полученные "вручную". Каждую кодон-оптимизированную последовательность синтезировали и клонировали в каркас GT005 в Genewiz (Таблица 1 и Фигура 1).

Таблица 1: Таблица, включающая перечень вариантов кодон-оптимизированных конструкций Афлиберцепта и референсные ссылки на инструменты оптимизации кодонов, доступные онлайн

Номер варианта	Код плазмиды	Инструменты оптимизации кодонов	Референсные ссылки
Дикий тип	RC288	Исходный "дикий тип"	Последовательность Афлиберцепта, полученная из drugbank.ca https://www.thermofisher.com/uk/en/home/life-science/cloning/gene-synthesis/geneart-gene-synthesis/geneoptimizer.html
1	RC290	GeneArt базовая	
2	RC291	GeneArt вручную	
3	RC292	Genscript базовая	https://www.genscript.com/
4	RC293	Genscript вручную	
5	RC294	GeneWiz базовая	https://www.genewiz.com/en-GB/

6	RC295	GeneWiz вручную	
7	RC296	IDT базовая	https://eu.idtdna.com/pages/tools/codon-optimization-tool?returnurl=%2FCodonOpt
8	RC297	IDT вручную	
9	RC298	JCat базовая	http://www.jcat.de/
10	RC299	JCat вручную	

В общем, моноцистронный вектор Афлиберцепта состоит из следующего:

- Инвертированные концевые повторы (ITR)
- ранний энхансерный элемент ЦМВ/промотор куриного β -актина (CAG)
- Нативный или кодон-оптимизированный сигнальный пептид секреции FHL1
- Афлиберцепт состоит из последовательностей из второго связывающего домена

рецептора фактора роста эндотелия сосудов VEGFR-1 и третьего связывающего домена VEGFR-2, слитых с последовательностью Fc-фрагмента IgG человека (WT=дикий тип; коАфлиберцепт=кодон-оптимизированная последовательность Афлиберцепта),

- Посттранскрипционный регуляторный элемент из вируса гепатита лесного сурка (WPRE)
- Сигнал полиаденилирования из бычьего гормона роста (bGHpA)

Пример 2 - Сравнение направленной векторами экспрессии афлиберцепта *in vitro*

Все кодон-оптимизированные векторы афлиберцепта были упакованы в AAV2 с использованием метода тройной трансфекции. Затем все векторы титровали с помощью кПЦР и трансдуцировали в HEK293 при MOI 1E4. Уровень экспрессии афлиберцепта измеряли в культуральных супернатантах через 72 ч после трансдукции с помощью ИФА. Эксперимент повторяли дважды. Как показано на Фигуре 2, все кодон-оптимизированные векторы афлиберцепта показали разные уровни экспрессии.

В частности, RC298 (Jcat базовый) и RC299 (Jcat вручную) показал самый высокий уровень экспрессии афлиберцепта по сравнению с контрольным вектором RC288, содержащим неоптимизированную по кодомам последовательность дикого типа.

Вестерн-блоттинг также проводили для подтверждения целостности экспрессированного белка афлиберцепта с векторов AAV2. Все векторы демонстрировали экспрессию белка афлиберцепта с ожидаемой молекулярной массой 115 кДа (в невозстанавливающих условиях), что было сравнимо с рекомбинантным белком афлиберцепта (Фигура 3А и В). Денситометрический анализ показал, что RC298 экспрессировал наиболее высокий уровень афлиберцепта (Фигура 3С), что согласуется с данными ИФА на Фигуре 2. В частности, RC299 показал aberrantную структуру белковых полос и поэтому был исключен из отбора.

В заключение, RC298 был выбран в качестве наиболее оптимальной кодон-оптимизированной последовательности афлиберцепта для последующего включения в бицистронный вектор.

Пример 3 - Конструирование бицистронных векторов, коэкспрессирующих негативный регулятор комплемента и Афлиберцепт

Были созданы бицистронные векторы, состоящие из промотора (CAG или ЦМВ), направляющего экспрессию либо кодон-оптимизированного CFI, либо кодон-оптимизированного FHL1, связанного с кодон-оптимизированным афлиберцептом (полученным из RC298), соединенных фуриновым F2A линкером. Положение негативного регулятора комплемента и афлиберцепта меняли местами в разных конфигурациях, как показано на Фигуре 4 и в Таблице 2.

В общем, бицистронные векторы Афлиберцепта состоят из следующего:

- Инвертированные концевые повторы (ITR)
- Цитомегаловирусный (ЦМВ) промотор или ранний энхансер ЦМВ/промотор куриного β-актина (CAG)
 - Кодон-оптимизированный фактор комплемента I (CFI) или кодон-оптимизированный FHL1
 - F2A пептид для расщепления фурином
 - Афлиберцепт состоит из последовательностей из второго связывающего домена рецептора фактора роста эндотелия сосудов VEGFR-1 и третьего связывающего домена VEGFR-2, слитых с последовательностью Fc-фрагмента человеческого IgG (WT=дикий тип; коАфлиберцепт=кодон-оптимизированная последовательность афлиберцепта)
 - Посттранскрипционный регуляторный элемент из вируса гепатита лесных сурков (WPRE) или укороченная версия WPRE, содержащая только минимальные гамма- и альфа-элементы (WPRE3).
 - Сигнал полиаденилирования из бычьего гормона роста (bGHpA)

Таблица 2: Таблица, включающая перечень бицистронных векторов и соответствующих конфигураций

Код плазмиды	Негативный регулятор комплемента	Молекула против VEGF	Описание упакованного генома	SEQ ID NO
RC313	CFI (кодон-оптимизированный)	Кодон-оптимизированная последовательность афлиберцепта из RC298	ITR-ЦМВ-коCFI-F2A-коАфлиберцепт-WPRE3-bGHpA-ITR	45
RC289	CFI (кодон-оптимизированный)	Кодон-оптимизированная последовательность афлиберцепта из RC298	ITR-ЦМВ-коАфлиберцепт-F2A-коCFI-WPRE3-bGHpA-ITR	46
RC322	CFI (кодон-оптимизированный)	Кодон-оптимизированная последовательность афлиберцепта из RC298	ITR-ЦМВ-коCFI-F2A-коАфлиберцепт-bGHpA-ITR	47
RC323	CFI (кодон-оптимизированный)	Кодон-оптимизированная	ITR-ЦМВ-коАфлиберцепт-F2A-	48

		последовательность афлиберцепта из RC298	коCFI-bGHpA-ITR	
RC304	FHL1 (кодон- оптимизированный)	Кодон- оптимизированная последовательность афлиберцепта из RC298	ITR-ЦМВ-coFHL1-F2A- коАфлиберцепт-WPRE- bGHpA-ITR	49
RC312	FHL1 (кодон- оптимизированный)	Кодон- оптимизированная последовательность афлиберцепта из RC298	ITR-ЦМВ- коАфлиберцепт-F2A- coFHL1-WPRE-bGHpA- ITR	50
RC318	FHL1 (кодон- оптимизированный)	Кодон- оптимизированная последовательность афлиберцепта из RC298	ITR-CAG-coFHL1-F2A- коАфлиберцепт-WPRE3- bGHpA-ITR	51
RC319	FHL1 (кодон- оптимизированный)	Кодон- оптимизированная последовательность афлиберцепта из RC298	ITR-CAG- коАфлиберцепт-F2A- coFHL1-WPRE3-bGHpA- ITR	52
RC324	FHL1 (кодон- оптимизированный)	Кодон- оптимизированная последовательность афлиберцепта из RC298	ITR-CAG-coFHL1-F2A- коАфлиберцепт-bGHpA- ITR	53
RC325	FHL1 (кодон- оптимизированный)	Кодон- оптимизированная последовательность афлиберцепта из RC298	ITR-CAG- коАфлиберцепт-F2A- coFHL1-bGHpA-ITR	54

Кодон-оптимизированной последовательностью CFI является SEQ ID NO: 35.

Кодон-оптимизированной последовательностью FHL1 является SEQ ID NO: 41.

Кодон-оптимизированной последовательностью афлиберцепта является SEQ ID NO: 11.

5'-ITR представляет собой SEQ ID NO: 55.

Промотор ЦМВ представляет собой SEQ ID NO: 59.

Промотор CAG представляет собой SEQ ID NO: 60.

Последовательность WPRE представляет собой SEQ ID NO: 63.

Последовательность WPRE3 представляет собой SEQ ID NO: 64.

Последовательность bGHpA представляет собой SEQ ID NO: 61.

3'-ITR представляет собой SEQ ID NO: 57.

Пример 4 - Функциональный анализ бицистронных векторов, коэкспрессирующих негативный регулятор комплемента и Афлиберцепт

Сравнение экспрессии с бицистронных векторов проводили путем трансдукции *in vitro* для сравнения экспрессии афлиберцепта, CFI и FHL1 с бицистронных векторов,

перечисленных на Фигуре 4, с моноцистронными аналогами.

Функциональный анализ афлиберцепта с бицистронных векторов проводили для определения связывания против VEGF и антипролиферативных свойств.

Все бицистронные векторы упаковывали либо в AAV8, либо в AAV2 с использованием метода тройной трансфекции. Трансдукцию *in vitro* проводили в клетках HEK293 при разных значениях MOI для сравнения экспрессии соответствующих трансгенов с бицистронных векторов, перечисленных в Таблице 2. Для количественного определения уровней экспрессии афлиберцепта, CFI и FHL1 с соответствующих бицистронных векторов использовали ИФА. Параллельно экспрессию сравнивали с моноцистронными аналогами. Бицистронные векторы AAV8 и AAV2 (RC289 и RC313) показали поддающиеся измерению уровни экспрессии CFI и афлиберцепта после трансдукции, при этом уровни экспрессии RC289, упакованного в виде векторов AAV8 и AAV2, были сопоставимы с моноцистронными аналогами (Фигуры 7А и В). Напротив, RC313 показал более низкие уровни экспрессии по сравнению с RC289 и соответствующими моноцистронными векторами. Аналогичным образом, бицистронные векторы AAV8 и AAV2 (RC304 и RC312) показали поддающиеся количественному определению уровни экспрессии FHL-1 и афлиберцепта, при этом уровни экспрессии были сопоставимы с уровнями для соответствующих моноцистронных векторов (RC146 - моноцистронный FHL1, RC298 - моноцистронный афлиберцепт) (Фигуры 7С и D).

В следующем эксперименте бицистронные векторы RC313, RC289, RC304 и RC312 были упакованы в AAV8 с использованием метода тройной трансфекции. Очищенные векторы трансдуцировали в HEK293 при MOI 3 в трех повторностях. Супернатанты отбирали и с помощью ИФА определяли количество афлиберцепта, CFI и FHL-1. В случае бицистронных векторов CFI-Афлиберцепта (RC313 и RC289) экспрессия афлиберцепта была сходной между двумя векторами, при этом RC289 демонстрировал более высокую экспрессию CFI, чем RC313 (Фигура 7Е). В случае бицистронных векторов FHL-1-Афлиберцепта экспрессия афлиберцепта опять же была сходной между векторами, и RC304 показал более высокую экспрессию FHL-1 при MOI 1E4 по сравнению с RC312 (Фигура 7F). При использовании те же образцов супернатантов клеточных культур из исследований экспрессии, Вестерн-блоттинг проводили для оценки экспрессии белка со всех бицистронных векторов. В невозстанавливающих условиях все супернатанты клеточных культур демонстрировали экспрессию белка CFI, FHL-1 и афлиберцепта, при этом все бицистронные векторы экспрессировали белок ожидаемого размера, подобный размеру контрольных рекомбинантных белков (см. Фигуру 8).

Эти результаты показывают, что все протестированные бицистронные векторы обеспечивали экспрессию двойного трансгена, а некоторые кандидаты демонстрировали уровни экспрессии, сходные с уровнями моноцистронных векторов. Все бицистронные векторы экспрессировали белки правильного размера.

Анализ связывания VEGF

Для определения аффинности связывания афлиберцепта, экспрессируемого с

бицистронных векторов, с VEGFA был проведен анализ равновесного связывания. Клетки HEK293 трансдуцировали моноцистронными векторами, экспрессирующими афлиберцепт (RC298), и бицистронными векторами, коэкспрессирующими CFI или FHL1 и афлиберцепт. Через 72 часа после трансдукции секретируемый афлиберцепт из культурального супернатанта экстрагировали и количественно определяли с помощью ИФА. Аффинность связывания секретируемого афлиберцепта, полученного с векторов, и рекомбинантного афлиберцепта (Эйлеа®) измеряли с помощью специфического и чувствительного ИФА для обнаружения свободного (несвязанного) человеческого VEGFA в смесях афлиберцепта (в диапазоне концентраций) с человеческим VEGFA, инкубируемых в течение фиксированного периода времени. Как показано на Фигуре 9, было обнаружено, что равновесие связывания (KD) афлиберцептов [IC50] с VEGFA, полученных как с моноцистронных, так и с бицистронных векторов, аналогично таковым для Эйлеа®.

Эти данные демонстрируют, что сконструированные бицистронные векторы способны экспрессировать афлиберцепт, который функционирует с такой же активностью, как Эйлеа®.

Анализ VEGF-индуцированной пролиферации

Для определения, способен ли афлиберцепт, полученный с вектора AAV, эффективно связывать VEGFA и эффективно блокировать способность VEGF индуцировать пролиферацию клеток, клетки эндотелия пупочной вены человека (HUVEC) подвергали стимуляции установленной концентрацией человеческого VEGFA и различными концентрациями афлиберцепта (полученного из культивированного супернатанта после AAV-трансдукции клеток HEK293, как указано выше) или Эйлеа® (положительный контроль). Через 72 часа после обработки измеряли ингибирование VEGF-индуцированной пролиферации клеток HUVEC при добавлении [3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-5-(3-карбоксиметоксифенил)-2-(4-сульфофенил)-2H-тетразолия с помощью спектрофотометрического анализа при 450/570 нм. Как показано на Фигуре 10, афлиберцепт, полученный с моноцистронных и бицистронных векторов, блокировал VEGF-индуцированную пролиферацию в анализах при 5-дневном росте этих клеток, при этом наблюдаемые антипролиферативные свойства были аналогичны таким свойствам Эйлеа®.

Эти данные демонстрируют, что сконструированные бицистронные векторы способны экспрессировать афлиберцепт, который функционирует с такой же активностью, как Эйлеа®.

Анализ расщепления C3b

Для анализа функциональной активности CFI или FHL1, секретируемых трансдуцированными клетками, кондиционированный супернатант клеток HEK293, трансдуцированных: AAV2, экспрессирующим CFI (GT005); AAV2, экспрессирующим FHL1 (RC146); AAV2, коэкспрессирующим CFI и афлиберцепт (RC289 или RC313), или AAV2, коэкспрессирующим FHL1 и афлиберцепт (RC312 или RC304), тестировали в

анализе с расщеплением C3b (Фигура 11). Принцип этого анализа основан на способности CFI в присутствии FHL1 расщеплять C3b до iC3b. ИФА на iC3b определяет количество продукта расщепления C3b, iC3b.

Анализы расщепления C3b проводили путем инкубирования 1 мкг C3b с рекомбинантным FHL1 (GTP Tech) и супернатантом клеток, трансдуцированных векторами, экспрессирующими CFI (GT005, RC289 и RC313), при молярном соотношении FHL1:CFI 4:1. Объем реакционной смеси довели до 20 мкл средой с пониженным содержанием сыворотки Opti-MEM™ и инкубировали реакционные смеси при 37°C в течение 20 минут. Супернатант клеток, трансдуцированных векторами FHL1 (RC146, RC312 или RC304), инкубировали с рекомбинантным CFI (Complement Technology, Inc, A138), 1 мкг C3b (Complement Technology, Inc, A113) и бессывороточной средой Opti-MEM™ при молярном соотношении FHL1:CFI 4:1 при 37°C в течение 20 минут в общем объеме 20 мкл.

Полученные образцы разбавляли 1:100 и 1:400 и наносили в ИФА на iC3b с использованием покрывающего антитела: мышинового антитела против активированного человеческого C3 (Nucult, NM2168), детектирующего антитела: крысиного антитела к C3dg (Nucult, NM2199) и вторичного антитела: мышинового антитела против иммуноглобулина крысы (Southern Biotech, 3061-05). Концентрации iC3b (нг/мл) вычисляли в соответствии со стандартной кривой, построенной при использовании очищенного человеческого белка iC3b (Complement Technology, Inc).

C3b, инкубируемый с рекомбинантными CFI и FHL1, служил в качестве положительного контроля (Фигура 11, столбцы слева). Отрицательный контроль только с C3b продемонстрировал, что расщепление C3b требует присутствия CFI и FHL1, поскольку C3b стабилен в отсутствие дополнительных компонентов. C3b, инкубируемый с кондиционированным супернатантом нетрансдуцированных клеток (НТД), также служил в качестве отрицательного контроля. Уровни iC3b с бицистронных векторов сравнивали с моноцистронными аналогами. Результаты ИФА на iC3b показали, что CFI и FHL1, экспрессируемые со всех бицистронных векторов, являются функциональными и могут вызывать расщепление C3b до iC3b (см. Фигуру 11).

Исследования in vivo

Исследования бицистронной экспрессии и эффективности in vivo проводили для определения экспрессии негативного регулятора комплемента и афлиберцепта с бицистронных векторов у грызунов. Также проводили исследования для демонстрации эффективности бицистронных векторов в модели лазерной ХНВ на мышах.

Пример 5 - Введение моноцистронных векторов, экспрессирующих CFI или FHL1, в модели ХНВ на мышах

Векторы AAV сначала доставляли субретинально в глаз мыши и оставляли на 4 недели. В день 0 все глаза после такой предварительной инъекции подвергали поражению с индуцированной лазером ХНВ путем прижигания лазером мембраны Бруха. Афлиберцепт (Эйлеа®) также доставляли путем интравитреальной инъекции в глаза с

ХНВ поражением в группе положительного контроля. Оптическую когерентную томографию и флуоресцентную ангиографию использовали для визуализации структуры сетчатки и областей поражения ХНВ, соответственно, в день 0 и день 4. В день 7 после прижигания лазером всех мышей умерщвляли и измеряли площадь ХНВ (определяли при окрашивании изолектином), площадь утечки ХНВ и оценку ХНВ (в баллах) в качестве первичного и вторичных конечных показателей (см. Фигуру 6).

Пример 6 - Исследования экспрессии in vivo

Данные моноцистронной экспрессии

Векторы AAV8 (моноцистронные), экспрессирующие средство против VEGF (афлиберцепт), вводили субретинально в правый глаз девятинедельным самцам мышей C57BL/6JRj в группах, представленных ниже. Успешное субретинальное введение подтверждали с помощью спектральной оптической когерентной томографии (СОКТ).

Группа 1: AAV8 RC298, доза 5×10^7 вг/глаз (n=9);

Группа 2: AAV8 RC298, доза 2×10^8 вг/глаз (n=10);

Группа 3: AAV8 RC298, доза 5×10^8 вг/глаз (n=10);

Группа 4: AAV8 RC298, доза 2×10^9 вг/глаз (n=10);

Группа 5: AAV8 RC298, доза 5×10^9 вг/глаз (n=10);

Группа 6: AAV8 RC298, доза 1×10^{10} вг/глаз (n=9).

Контралатеральный глаз каждого животного служил в качестве контроля без инъекции. Через пять недель после инъекции всех животных умерщвляли. Оба глаза, после инъекции и контралатеральный без инъекции, иссекали и собирали глазную жидкость в 40 мкл PBS (содержащего ингибиторы протеаз) в пробирки с завинчивающимися крышками и быстро замораживали до анализа белка. Задние глазные чаши помещали в новую пробирку, содержащую 50 мкл раствора RNeasy Lysis Buffer, и затем измельчали с помощью анатомических ножниц. Разрезанные глазные чаши затем быстро замораживали в жидком азоте в течение 30 секунд и добавляли 50 мкл RLT буфера, содержащего β -меркаптоэтанол, с последующей гомогенизацией в течение 2 мин при использовании гомогенизатора. 200 мкл RLT буфера с β -меркаптоэтанолом добавляли к гомогенатам глазных чаш и перемешивали пипетированием вверх вниз. Все гомогенаты глазных чаш хранили по меньшей мере 24 ч при -80°C перед выделением РНК.

Выделение РНК и количественная ОТ-ПЦР

РНК выделяли из тканей задней части глазной чаши крыс с использованием набора RNeasy Mini в соответствии с протоколом производителя (Qiagen). Замороженные гомогенаты глазных чаш размораживали на льду и подвергали механическому измельчению с использованием QIAshredder. После измельчения к гомогенату добавляли 70% EtOH и переносили смесь на колонку RNeasy. Колонку центрифугировали и промывали буфером RW1. Затем мембрану колонки обрабатывали ДНКазой I путем инкубирования при комнатной температуре в течение 15 мин с последующей промывкой буферами RW1 и RPE. Затем РНК элюировали водой без РНКаз в конечном объеме 50 мкл. Концентрацию РНК в каждом образце затем измеряли с помощью наноспектрометра

NeoDot (Generon).

Обратную транскрипцию проводили при использовании набора SuperScript III Reverse Transcriptase Kit (Invitrogen). Полученную с транскрипта мРНК количественно определяли с использованием следующих праймеров, направленных на последовательность bGHPA для образцов мышей: bGHPA FR 5'-CATCGCATTTGTCTGAGTAGGT-3' и bGHPA Rv 5'-AGCATGCCTGCTATTGTCTT-3'. Все кОТ-ПЦР проводили при использовании системы ПЦР с детектированием в реальном времени CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (BioRad) с химией SYBR Green. В качестве стандарта использовали линейаризованную плазмиду с транскриптом, разведенную до известных концентраций. Реакции с SYBR Green проводили следующим образом: начальная денатурация при 95°C в течение 3 мин, затем 40 циклов по 10 сек при 95°C и 30 сек при 56°C.

На Фигуре 12 показана экспрессия мРНК Афлиберцепта для Групп 1-6.

Количественный анализ экспрессии афлиберцепта

Несвязавшийся афлиберцепт в образцах глазной жидкости измеряли с помощью количественного ИФА сэндвич-типа в соответствии с протоколом производителя (ImmunoGuide). Вкратце, разведенные стандарты афлиберцепта и образцы глазной жидкости инкубировали в микротитровальном планшете, покрытом рекомбинантным человеческим фактором роста эндотелия сосудов А (rhVEGF-A). После инкубирования лунки промывали и добавляли моноклональные антитела против человеческого IgG, конъюгированные с пероксидазой хрена (HRP), для связывания с Fc-компонентом афлиберцепта, предварительно связавшегося с rhVEGF-A на поверхности лунок. После инкубирования лунки промывали и определяли связанную ферментативную активность при добавлении хромоген-субстрата. Проявившаяся окраска была пропорциональна количеству афлиберцепта в образце или стандарте, и оптическую плотность (ОП) измеряли с помощью фотометра при 450 нм (контроль при ОП 620 нм был необязательным).

На Фигуре 13 показана экспрессия белка Афлиберцепта для групп 1-6.

Данные бицистронной экспрессии

Бицистронные векторы AAV, коэкспрессирующие средство против VEGF (афлиберцепт) и регуляторы комплемента (hCFI или FHL-1), вводили субретинально в правый глаз (OD) 10-недельных самцов мышей C57BL/6. Успешное субретинальное введение подтверждали с помощью спектральной оптической когерентной томографии (СОКТ). Контралатеральный глаз каждого животного служил в качестве контроля без инъекции. Через четыре недели мышей умерщвляли и собирали глазную жидкость и задние глазные чаши.

Исследование состояло из восьми групп лечения:

Группа 1: AAV8-RC313, 5×10^7 вг/глаз (n=10 мышей);

Группа 2: AAV8-RC313, 5×10^8 вг/глаз (n=10);

Группа 3: AAV8-RC289, 5×10^7 вг/глаз (n=10);

Группа 4: AAV8-RC289, 5×10^8 вг/глаз (n=10);

Группа 5: AAV8-RC304, 5×10^7 вг/глаз (n=9);

Группа 6: AAV8-RC304, 5×10^8 вг/глаз (n=10);

Группа 7: AAV8-RC312, 5×10^7 вг/глаз (n=9);

Группа 8: AAV8-RC312, 5×10^8 вг/глаз (n=10).

Выделение РНК и количественная ОТ-ПЦР

Задние глазные чаши помещали в новую пробирку, содержащую 50 мкл раствора RNeasy Lysis Buffer, и затем измельчали анатомическими ножницами. Разрезанные глазные чаши затем быстро замораживали в жидком азоте в течение 30 секунд и добавляли 50 мкл RLT буфера, содержащего β -меркаптоэтанол, с последующей гомогенизацией в течение 2 мин при использовании гомогенизатора. 200 мкл RLT буфера с β -меркаптоэтанолом добавляли к гомогенатам глазных чаш и перемешивали пипетированием вверх вниз. Все гомогенаты глазных чаш хранили по меньшей мере 24 ч при -80°C перед выделением РНК.

РНК выделяли из тканей задней части глазной чаши крыс при использовании набора RNeasy Mini в соответствии с протоколом производителя (Qiagen). Замороженные гомогенаты глазных чаш размораживали на льду и подвергали механическому измельчению с использованием QIAshredder. После измельчения к гомогенату добавляли 70% EtOH и переносили смесь на колонку RNeasy. Колонку центрифугировали и промывали буфером RW1. Затем мембрану колонки обрабатывали ДНКазой I путем инкубирования при комнатной температуре в течение 15 мин с последующей промывкой буферами RW1 и RPE. Затем РНК элюировали водой без РНКаз в конечном объеме 50 мкл. Концентрацию РНК в каждом образце затем измеряли с помощью наноспектрометра NeoDot (Generon).

Обратную транскрипцию проводили при использовании набора SuperScript III Reverse Transcriptase Kit (Invitrogen). Полученную с трансгена мРНК определяли количественно с использованием следующих праймеров, направленных на последовательность bGHPA для образцов мышей: bGHPA FR 5'-CATCGCATTTGTCTGAGTAGGT-3' и bGHPA Rv 5'-AGCATGCCTGCTATTGTCTT-3'. Все кОТ-ПЦР проводили при использовании системы ПЦР с детектированием в реальном времени CFX96 Touch (BioRad) с химией SYBR Green. В качестве стандарта использовали линейризованную плазмиду с трансгеном, разведенную до известных концентраций. Реакции с SYBR Green проводили следующим образом: начальная денатурация при 95°C в течение 3 мин, затем 40 циклов по 10 сек при 95°C и 30 сек при 56°C .

На Фигуре 14 показана экспрессия мРНК афлиберцепта с бицистронных векторов.

Количественный анализ экспрессии афлиберцепта и комплемента

Афлиберцепт

Несвязавшийся афлиберцепт в образцах глазной жидкости измеряли с помощью количественного ИФА сэндвич-типа в соответствии с протоколом производителя (ImmunoGuid д). Вкратце, разведенные стандарты афлиберцепта и образцы глазной жидкости инкубировали в микротитровальном планшете, покрытом рекомбинантным

человеческим фактором роста эндотелия сосудов А (rhVEGF-A). После инкубирования лунки промывали и добавляли моноклональные антитела против человеческого IgG, конъюгированные с пероксидазой хрена (HRP), для связывания с Fc-компонентом афлиберцепта, предварительно связанного rhVEGF-A на поверхности лунок. После инкубирования лунки промывали и определяли связанную ферментативную активность путем добавления хромоген-субстрата. Проявившаяся окраска была пропорциональна количеству афлиберцепта в образце или стандарте, и оптическую плотность (ОП) измеряли с помощью фотометра при 450 нм (контроль при ОП 620 нм был необязательным).

Экспрессия белка CFI в глазной жидкости

CFI человека в образцах глазной жидкости количественно определяли при использовании технологии детектирования электрохемилюминесценции MSD. 96-луночный точечный планшет MSD Gold SECTOR plate со стрептавидином покрывали биотинилированным антителом против CFI при встряхивании (850 об/мин) в течение 1 часа при комнатной температуре. Стандарты CFI (Complement Technology) и образцы разводили соответствующим образом. Планшет промывали 0,05% PBS-Tween и добавляли в планшет 25 мкл стандартов, контролей и образцов. Планшет закрывали и инкубировали при встряхивании (850 об/мин) при комнатной температуре в течение 1 часа. Затем планшет промывали, как описано выше, и добавляли в лунки по 25 мкл детектирующего антитела против FI (анти-FI, A231) и инкубировали при встряхивании (850 об/мин) при комнатной температуре в течение 1 часа. После инкубирования планшет промывали, как раньше, и в каждую лунку добавляли по 150 мкл 2× Read Buffer T с последующим считыванием на планшетном спектрофотометре MSD.

Экспрессия белка FHL-1 в глазных жидкостях

FHL-1 в образцах глазной жидкости определяли количественно при использовании технологии детектирования электрохемилюминесценции MSD. 96-луночный точечный планшет MSD Gold SECTOR plate со стрептавидином покрывали биотинилированным антителом против FHL-1 при встряхивании (850 об/мин) в течение 1 ч при комнатной температуре. Стандарты и образцы FHL-1 разводили соответствующим образом. Планшет промывали 0,05% PBS-Tween и в планшет добавляли по 25 мкл стандартов, контролей и образцов. Планшет закрывали и инкубировали при встряхивании (850 об/мин) при комнатной температуре в течение 1 часа. Затем планшет промывали, как описано выше, и добавляли в лунки по 25 мкл антитела для обнаружения FH (анти-FH, MA170057, Invitrogen) и инкубировали при встряхивании (850 об/мин) при комнатной температуре в течение 1 часа. После инкубирования планшет промывали, как раньше, и в каждую лунку добавляли по 150 мкл 2× Read Buffer T перед считыванием на планшетном спектрофотометре MSD.

На Фигуре 15 показана экспрессия белков Афлиберцепта, CFI и FHL1 с бицистронных векторов.

Пример 7 - Эффективность in vivo в модели хориоидальной

неоваскуляризации, индуцированной лазером у мышей

Пять групп мышей получали односторонние (в правый глаз) субретинальные инъекции различных векторов AAV. Успешное субретинальное введение терапии подтверждали сразу после введения AAV с помощью спектральной оптической когерентной томографии (СОКТ). Через четыре недели после введения векторов индуцировали ХНВ с помощью лазерной фотокоагуляции. Вкратце, животные после анестезии получали каплю 0,5% тропикамида (Oftan Tropicamid, Santen Oy) для расширения зрачков. В глаз наносили каплю Viscotears (Dr. Gerhard Mann Chem.-Pharm., Germany) и использовали покровное стекло для аппланации роговицы. Три лазерных поражения были сделаны унилатерально на правом глазу вокруг диска зрительного нерва при использовании диодного лазера 532 нм (размер пятна: 100 мкм, мощность: 130 мВт, время: 120 мс, Oculight TX, Iridex Corp., USA). Успешное получение поражений ХНВ подтверждали с помощью СОКТ и флуоресцентной ангиографии (ФА). Сразу после индукции ХНВ дополнительная группа мышей получала интравитреальное введение афлиберцепта. Мышей снова визуализировали на четвертый и седьмой день после лазерной обработки с помощью СОКТ и ФА, после чего умерщвляли.

Облученные лазером глаза вылущивали и иссекали. Приготавливали плоские препараты хориоидеи и окрашивали флуоресцеин-меченным лектином I (GSLI) Griffonia simplicifolia, изолектином B4 (FL-1201, Vector Laboratories, USA), для оценки неоваскуляризации. Вкратце, плоские препараты промывали трис-буферным физраствором (TBS) и блокировали 10% нормальной козьей сывороткой (NGS), 0,5% Triton X-100 в TBS, pH 7,4 (TBST), в течение 1 часа при комнатной температуре (КТ). Образцы промывали TBS и инкубировали с флуоресцеин-меченным изолектином GS-IB4 (1:200, Vector Laboratories) в течение ночи при +4°C в 1% NGS, разведенном в 0,1% TBST. После этого образцы промывали 3 раза по 10 минут 1% NGS, разбавленным 0,1% TBST, контрастно окрашивали DAPI и наносили на предметные стекла с использованием заливочной среды Fluoroshield™ (Sigma-Aldrich). Образцы хориоидеи визуализировали с помощью микроскопа DMi8 THUNDER 3D (Leica Microsystems, Germany). Окрашенные области обводили и измеряли окрашенную площадь при использовании программы для обработки изображений FIJI (Schindelin et al. 2012).

Группа 1: RC268, пустой, 5E8 в День -28 и индукция ХНВ;

Группа 2: RC289, 5E7 в День -28 и индукция ХНВ;

Группа 3: RC289, 5E8 в День -28 и индукция ХНВ;

Группа 4: RC304, 5E7 в День -28 и индукция ХНВ;

Группа 5: RC304, 5E8 в День -28 и индукция ХНВ;

Группа 6: Индукция ХНВ и лечение афлиберцептом (80 мкг/глаз) в день 0.

Количественное определение площади утечки ХНВ и размера поражения ХНВ

Флуоресцентная ангиография (ФА): Повышение проницаемости сосудов на уровне хориоидеи исследовали с помощью системы Heidelberg Spectralis HRA (Heidelberg Engineering, Germany). Вкратце, каплю 0,5% тропикамида (Oftan Tropicamid, Santen Oy)

вводили на роговицу мыши после анестезии для расширения зрачков и помещали мышью в держатель для мышей. После выравнивания диска зрительного нерва на уровне сетчатки с помощью инфракрасной отражательной камеры подкожно вводили 2,5% раствор натрий флуоресцеина (Sigma-Aldrich, Finland) путем п/к инъекции (30 мкл/10 г). Последовательные флуоресцентные изображения (чувствительность: 45; среднее ART: 5 кадров) получали каждые 60 секунд с уровнем фокусировки сетчатки и хориоидеи в течение 5 минут после введения флуоресцеина.

Спектральная оптическая когерентная томография (СОКТ): СОКТ проводили для проверки субретинального введения до и после индукции ХНВ, а также в дни 4 и 7 после индукции ХНВ. Сразу после ФА мышью обследовали с помощью системы СОКТ Envisu R2200 (Bioptigen Inc./Leica Microsystems, USA). Сканируемая область охватывает $1,4 \times 1,4$ мм² сетчатки с центром вокруг зрительного нерва. Каждое сканирование состоит из 100 В сканов, каждый из которых состоит из 1000 А сканов.

Область утечки ХНВ при оценке с помощью визуализации ФА глазного дна и последующего анализа изображений ИИ. Сканирование ФА анализировали с помощью запатентованного алгоритма, в котором используется комбинация сверточной нейронной сети (CNN), предназначенной для семантической сегментации, и традиционных алгоритмов машинного зрения. Нейронная сеть была обучена распознавать и количественно определять поражения ХНВ с использованием подхода трансферного обучения. Результаты модели были рассмотрены и при необходимости скорректированы исследователем, не имевшим допуска к информации о лечении.

Области, обработанные лазером, были качественно классифицированы как протекающие или непротекающие по данным сканирования ФА и подтверждены сканированием СОКТ.

Анализ данных

Количественные данные были нанесены на график, проанализированы и представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение (SD). Статистический анализ проводили с использованием программы GraphPad Prism (версии 8.0.1 GraphPad Software, USA). Различия считали статистически значимыми на уровне $p < 0,05$.

Результаты показаны на Фигуре 16.

Все публикации, указанные в приведенном выше описании, включены в настоящий документ посредством отсылки. Различные модификации и вариации раскрытых средств, композиций, применений и способов изобретения будут очевидны специалисту в данной области без выхода за рамки объема и сущности изобретения. Хотя изобретение было раскрыто в связи с конкретными предпочтительными вариантами осуществления, следует понимать, что заявленное изобретение не должно быть излишне ограничено такими конкретными вариантами осуществления. Фактически предполагается, что различные модификации раскрытых способов осуществления изобретения, которые очевидны для специалиста, включены в объем следующей формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенный полинуклеотид, включающий нуклеотидные последовательности, кодирующие: (i) молекулу против VEGF и (ii) негативный регулятор комплемента.
2. Выделенный полинуклеотид по п.1, где молекула против VEGF выбрана из Ig-слитого белка, антитела, полипептида, пептида, неиммуноглобулинового каркаса, антисмыслового олигонуклеотида, миРНК, мшРНК, CRISPR-гидовой цепи и аптамера.
3. Выделенный полинуклеотид по п.2, где молекула против VEGF выбрана из афлиберцепта, ранибизумаба, бевацизумаба, бролуцизумаба и пэгаптаниба.
4. Выделенный полинуклеотид по п.3, где молекулой против VEGF является афлиберцепт, например, где афлиберцепт кодируется полинуклеотидной последовательностью, включающей любую из SEQ ID NO: 3-11.
5. Выделенный полинуклеотид по любому из предыдущих пунктов, где негативный регулятор комплемента выбран из фактора комплемента I (CFI), фактор комплемента H-подобного белка 1 (FHL1), фактора комплемента H (CFH), рецептора комплемента типа 1 (CR1), мембранного кофакторного белка (MCP), фактора распада комплемента (DAF), MAC-ингибиторного белка (MAC-IP), C1-ингибитора, ингибитора анафилатоксинов, C4b-связывающего белка (C4BP), кластерина, витронектина или его варианта или фрагмента.
6. Выделенный полинуклеотид по п.5, где негативный регулятор комплемента выбран из CFI и FHL1 или их варианта или фрагмента.
7. Выделенный полинуклеотид по любому из пп.3-6, где нуклеотидная последовательность, кодирующая афлиберцепт, обладает по меньшей мере 75% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 11.
8. Выделенный полинуклеотид по п.6 или 7, где нуклеотидная последовательность, кодирующая CFI, обладает по меньшей мере 75% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 35 или 36, или нуклеотидная последовательность, кодирующая FHL-1, обладает по меньшей мере 75% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 41.
9. Выделенный полинуклеотид по любому из пп.3-8, где полинуклеотид включает нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 45-54, или нуклеотидную последовательность, обладающую по меньшей мере 75% идентичностью последовательности с ней.
10. Выделенный полинуклеотид по любому из пп.1-9, где полинуклеотид меньше или равен 4,7 тн.
11. Вектор, включающий выделенный полинуклеотид по любому из пп.1-10.
12. Вектор по п.11, где вектор является вектором на основе аденоассоциированного вируса (AAV), необязательно в форме вирусной векторной частицы, предпочтительно векторной частицы AAV, включающей геном AAV2 и капсидные белки AAV2 или AAV8.
13. Фармацевтическая композиция, включающая выделенный полинуклеотид или вектор по любому из пп.1-12 в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем, разбавителем или вспомогательным веществом.
14. Выделенный полинуклеотид, вектор или фармацевтическая композиция по

любому из пп.1-13 для применения в терапии.

15. Выделенный полинуклеотид, вектор или фармацевтическая композиция по любому из пп.1-14 для применения при лечении или профилактике комплемент-опосредованного заболевания глаза, например, возрастной макулодистрофии (ВМД), диабетической ретинопатии, глаукомы, болезни Штаргардта, центральной серозной хориоретинопатии, пигментного ретинита, полипоидной хориоидальной васкулопатии, диабетического макулярного отека, окклюзии ветки вены сетчатки или увеита, предпочтительно ВМД.

16. Выделенный полинуклеотид, вектор или фармацевтическая композиция для применения по п.15, где ВМД является влажной ВМД и/или сухой ВМД.

17. Выделенный полинуклеотид, вектор или фармацевтическая композиция для применения по п.15, где: i) ВМД является влажной ВМД, и применение дополнительно предотвращает и/или лечит возникновение сухой ВМД у субъекта, или ii) ВМД является сухой ВМД, и применение дополнительно предотвращает и/или лечит возникновение влажной ВМД у субъекта, или iii) применение предотвращает и/или лечит сухую ВМД и влажную ВМД одновременно.

18. Выделенный полинуклеотид, вектор или фармацевтическая композиция для применения по п.17, где ВМД является влажной ВМД, и применение дополнительно предотвращает и/или лечит возникновение сухой ВМД у субъекта.

19. Выделенный полинуклеотид, вектор или фармацевтическая композиция для применения по любому из пп.15-18, где:

(i) формирование географической атрофии предотвращено или уменьшено, и/или количество географической атрофии уменьшено, или где прогрессия географической атрофии замедлена;

(ii) присутствует по меньшей мере 10% снижение увеличения области географической атрофии в течение 12 месяцев после введения в подвергнутом лечению глазу субъекта по сравнению с не подвергавшимся лечению глазу за тот же период; или

(iii) введение выделенного полинуклеотида, вектора или фармацевтической композиции повышает уровень С3b-инактивирующей и iC3b-расщепляющей активности у субъекта, или в глазу, например, в пигментном эпителии сетчатки (ПЭС), субъекта, необязательно до уровня, превышающего нормальный уровень у субъекта, или в его глазу или ПЭС.

20. Выделенный полинуклеотид, вектор или фармацевтическая композиция для применения по любому из пп.15-19, где i) неоваскуляризация предотвращена или уменьшена, ii) трансудация предотвращена или уменьшена, и/или iii) отек сетчатки предотвращен или уменьшен.

21. Выделенный полинуклеотид, вектор или фармацевтическая композиция для применения по любому из пп.15-20, где полинуклеотид, вектор, клетку или фармацевтическую композицию вводят внутриглазным путем, например, путем субретинальной, прямой ретинальной, супрахориоидальной или интравитреальной

инъекции.

22. Продукт, включающий: (i) молекулу против VEGF; и (ii) негативный регулятор комплемента, или нуклеотидные последовательности, кодирующие их, в виде комбинированного препарата для: i) одновременного, отдельного или последовательного применения при лечении влажной ВМД, и где, применение дополнительно предотвращает и/или лечит возникновение сухой ВМД у субъекта; или ii) одновременного, отдельного или последовательного применения при лечении сухой ВМД, и где применение дополнительно предотвращает и/или лечит возникновение влажной ВМД у субъекта, или iii) одновременного, отдельного или последовательного применения для одновременного лечения и/или профилактики сухой ВМД и влажной ВМД.

23. Продукт для применения по п.22, для одновременного, отдельного или последовательного применения при лечении влажной ВМД, и где применение дополнительно предотвращает и/или лечит возникновение сухой ВМД у субъекта.

24. Продукт для применения по п.22 или 23, где молекула против VEGF выбрана из Ig-слитого белка, антитела, полипептида, пептида, неиммуноглобулинового каркаса, антисмыслового олигонуклеотида, миРНК, мшРНК, CRISPR-гидовой цепи и аптамера, где молекула против VEGF предпочтительно выбрана из афлиберцепта, ранибизумаба, бевацизумаба, бролуцизумаба и пэгаптаниба.

25. Продукт для применения по любому из пп.22-24, где негативный регулятор комплемента выбран из фактора комплемента I (CFI), фактор комплемента H-подобного белка 1 (FHL1), фактора комплемента H (CFH), рецептора комплемента типа 1 (CR1), мембранного кофакторного белка (MCP), фактора распада комплемента (DAF), MAC-ингибиторного белка (MAC-IP), C1-ингибитора, ингибитора анафилатоксинов, C4b-связывающего белка (C4BP), кластерина, витронектина или их варианта или фрагмента, где негативный регулятор комплемента предпочтительно выбран из CFI или FHL1 или их варианта или фрагмента.

26. Продукт, включающий: (i) молекулу против VEGF; и (ii) Фактор I, или нуклеотидные последовательности, кодирующие их, в виде комбинированного препарата для одновременного, отдельного или последовательного применения в качестве лекарственного средства.

27. Продукт для применения по п.26, для применения при лечении или профилактике комплемент-опосредованного глазного нарушения, такого как возрастная макулодистрофия (ВМД), диабетическая ретинопатия, глаукома, болезнь Штаргардта, центральная серозная хориоретинопатия, пигментный ретинит, полипоидная хориоидальная васкулопатия, диабетический макулярный отек, окклюзия ветки вены сетчатки или увеит, предпочтительно ВМД.

28. Продукт для применения по любому из пп.22-27, где:

(i) формирование географической атрофии предотвращено или уменьшено, и/или количество географической атрофии уменьшено, или где прогрессия географической атрофии замедлена;

(ii) присутствует по меньшей мере 10% снижение увеличения области географической атрофии в течение 12 месяцев после введения в подвергнутом лечению глазу субъекта по сравнению с не подвергавшимся лечению глазу за тот же период; или

(iii) введение выделенного полинуклеотида, вектора или фармацевтической композиции повышает уровень С3b-инактивирующей и iC3b-расщепляющей активности у субъекта, или в глазу, например, в пигментном эпителии сетчатки (ПЭС), субъекта, необязательно до уровня, превышающего нормальный уровень у субъекта, или в его глазу или ПЭС.

29. Продукт для применения по любому из пп.22-28, где: i) неоваскуляризация предотвращена или уменьшена, ii) трансудация предотвращена или уменьшена, и/или iii) отек сетчатки предотвращен или уменьшен.

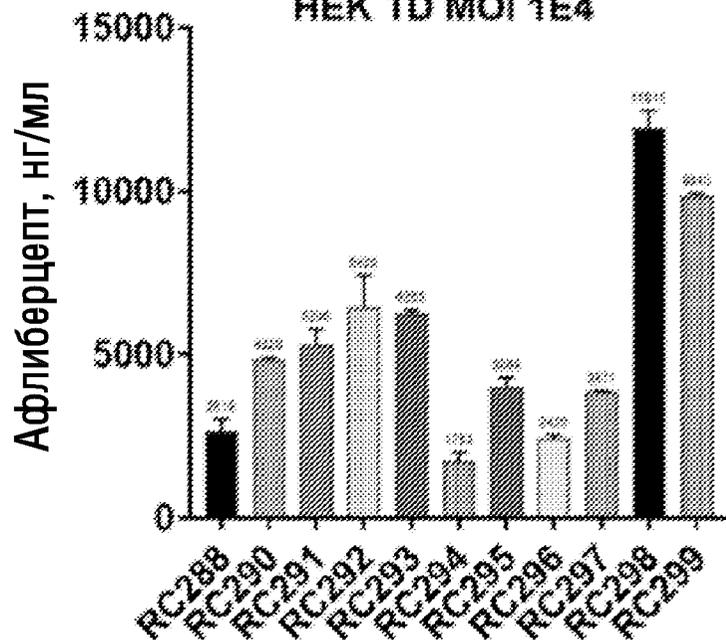
По доверенности

ФИГ.1

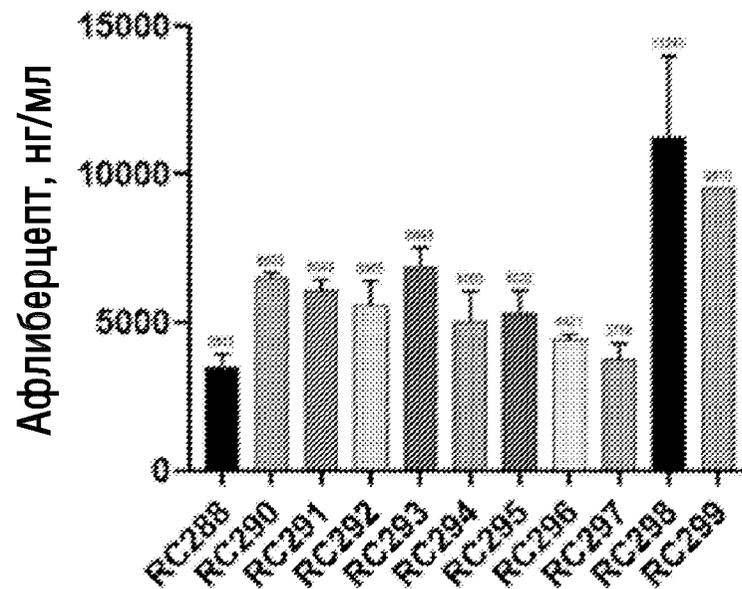


ФИГ.2

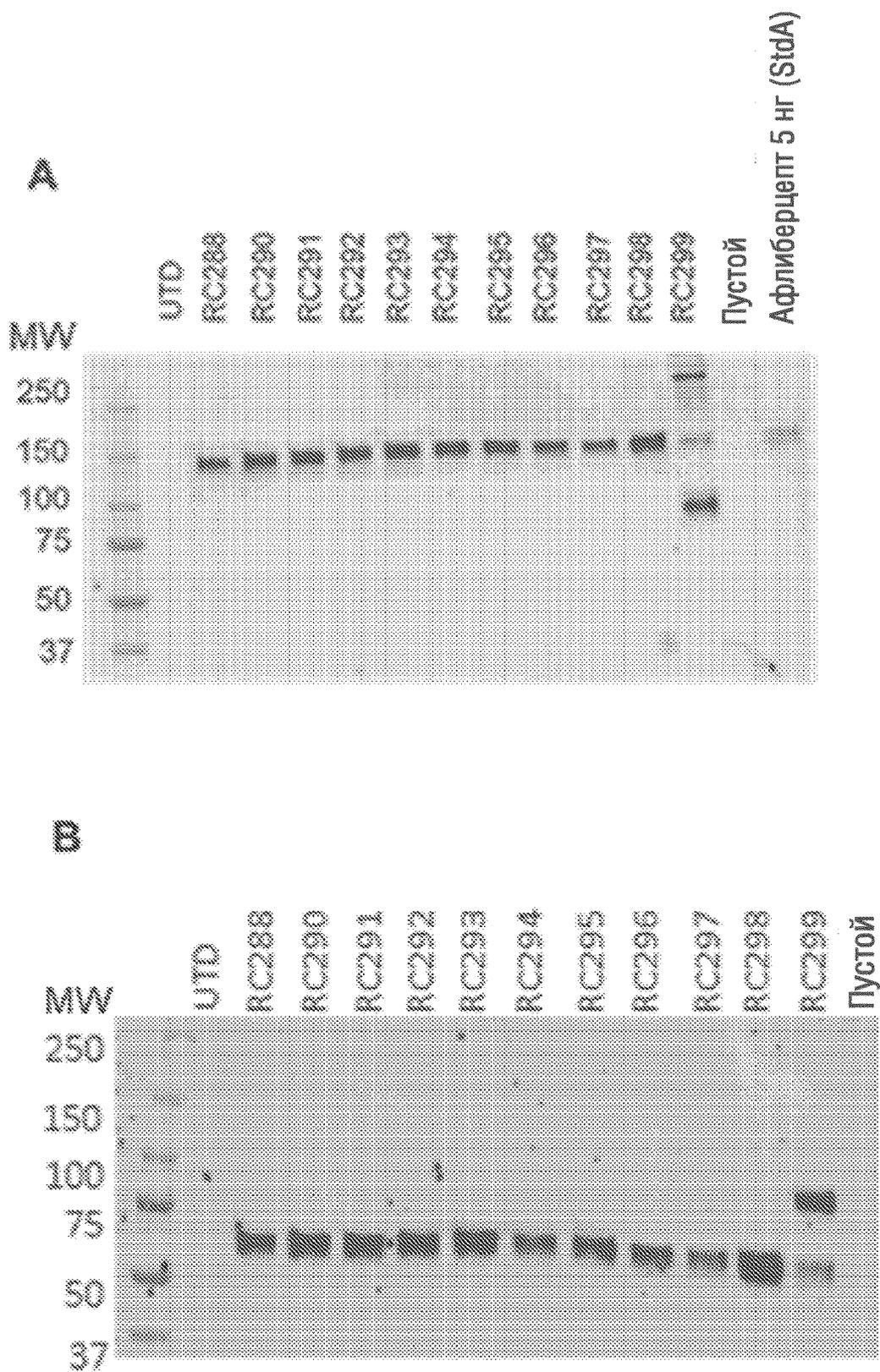
Эксперимент 1 ИФА Афлиберцепта 1:100
HEK TD MOI 1E4



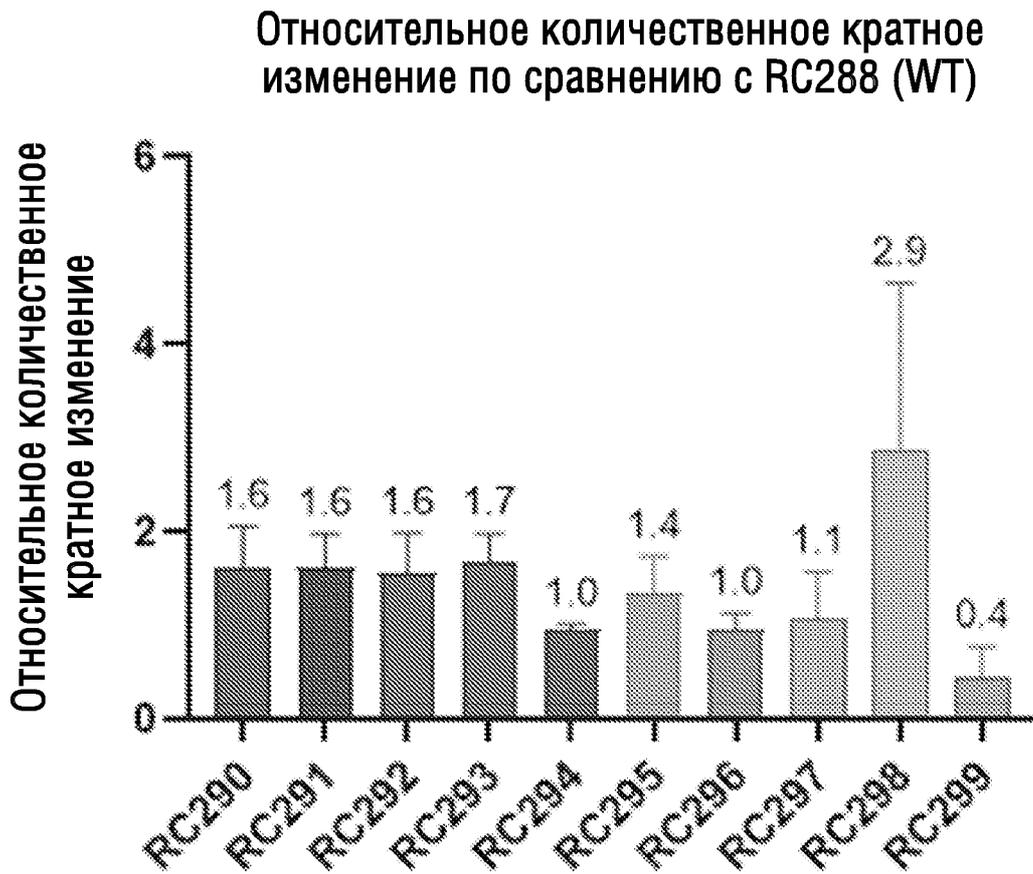
Эксперимент 2 ИФА Афлиберцепта 1:100
HEK TD MOI 1E4



ФИГ.3



ФИГ.3, продолжение



ФИГ.4

Бицистронные конфигурации (CFI и Афлиберцепт)

Размер от ITR к ITR

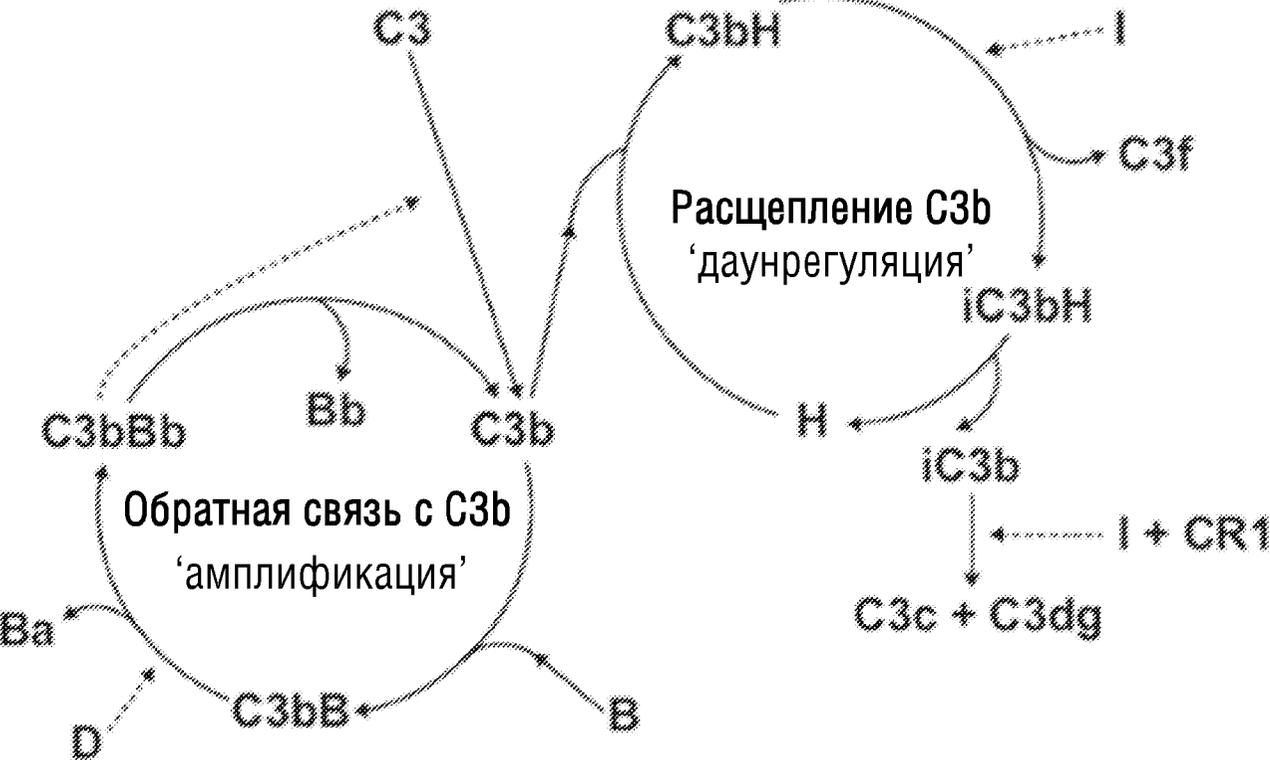
RC313	ITR	CMV	CFI	коАфлиберцепт	BCNRA	ITR	4548 пн
RC289	ITR	CMV	коАфлиберцепт	CFI	BCNRA	ITR	4548 пн
RC322	ITR	CMV	CFI	коАфлиберцепт	BCNRA	ITR	4303 пн
RC323	ITR	CMV	коАфлиберцепт	CFI	BCNRA	ITR	4303 пн

Бицистронные конфигурации (FHL1 и Афлиберцепт)

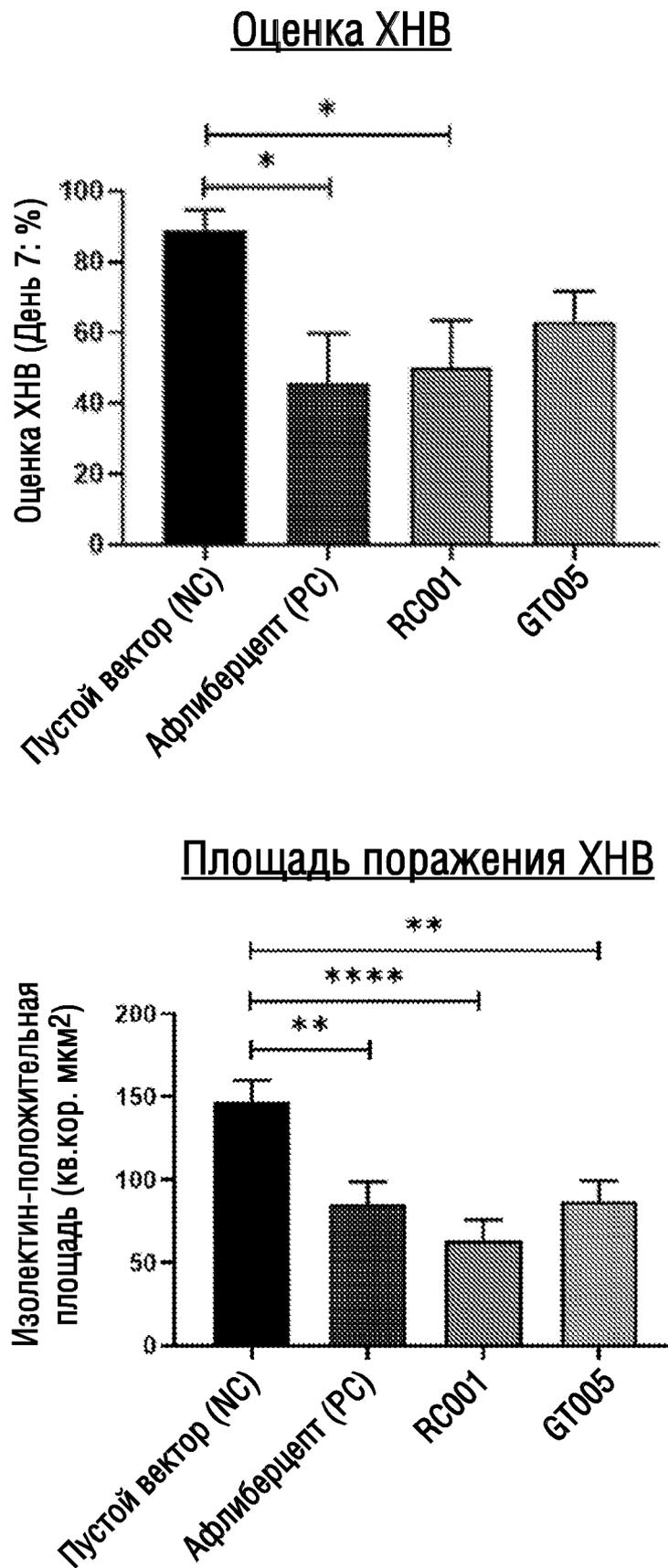
Размер от ITR к ITR

RC304	ITR	CMV	FHL1	коАфлиберцепт	WPRE	BCNRA	ITR	4524 пн
RC312	ITR	CMV	коАфлиберцепт	FHL1	WPRE	BCNRA	ITR	4524 пн
RC318	ITR	CAG	CFI	коАфлиберцепт	BCNRA	ITR	4503 пн	
RC319	ITR	CAG	коАфлиберцепт	FHL1	BCNRA	ITR	4503 пн	
RC324	ITR	CAG	CFI	коАфлиберцепт	BCNRA	ITR	4258 пн	
RC325	ITR	CAG	коАфлиберцепт	FHL1	BCNRA	ITR	4258 пн	

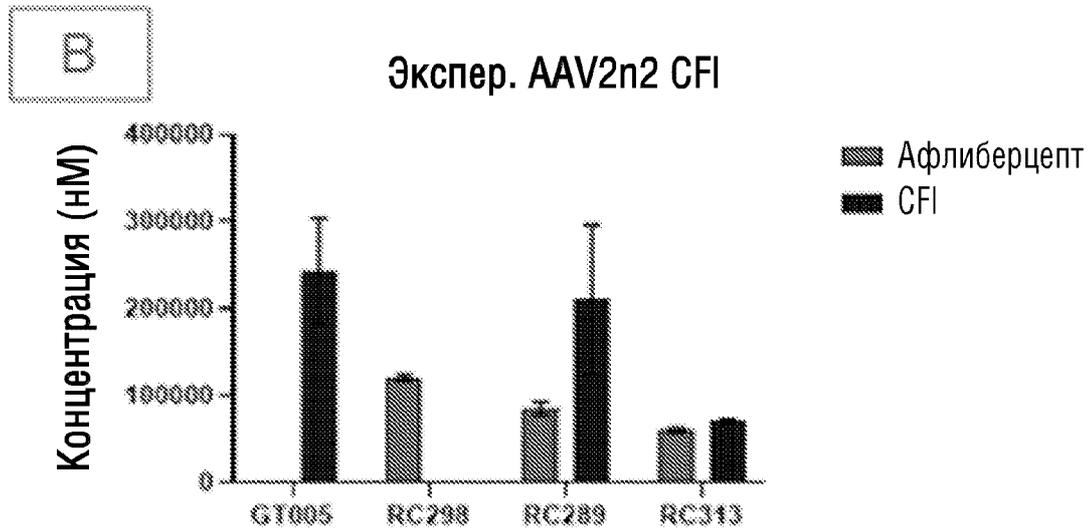
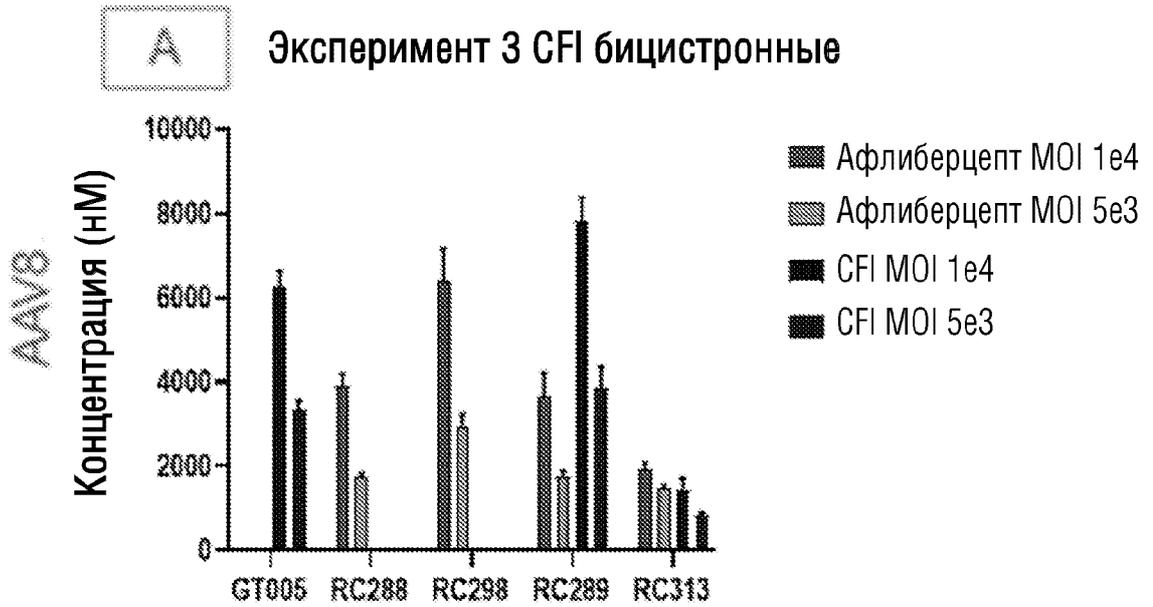
ФИГ.5



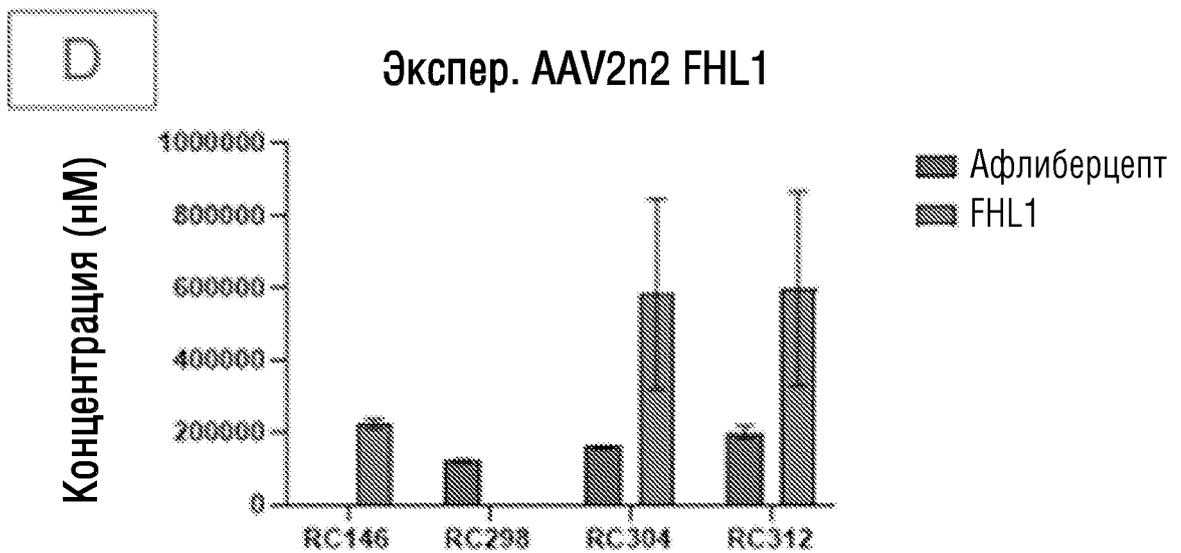
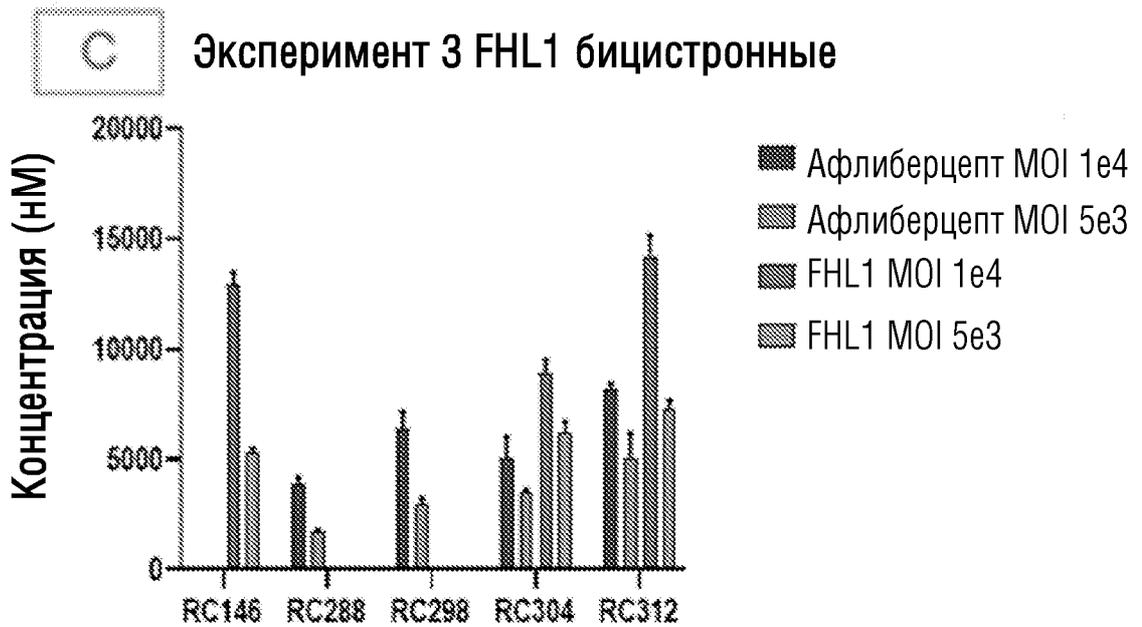
ФИГ.6



ФИГ.7



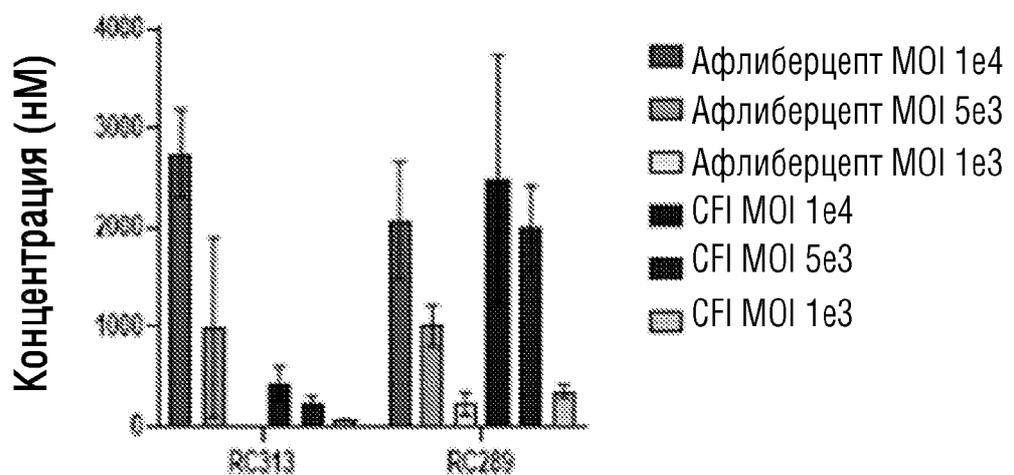
ФИГ.7, продолжение



ФИГ.7, продолжение

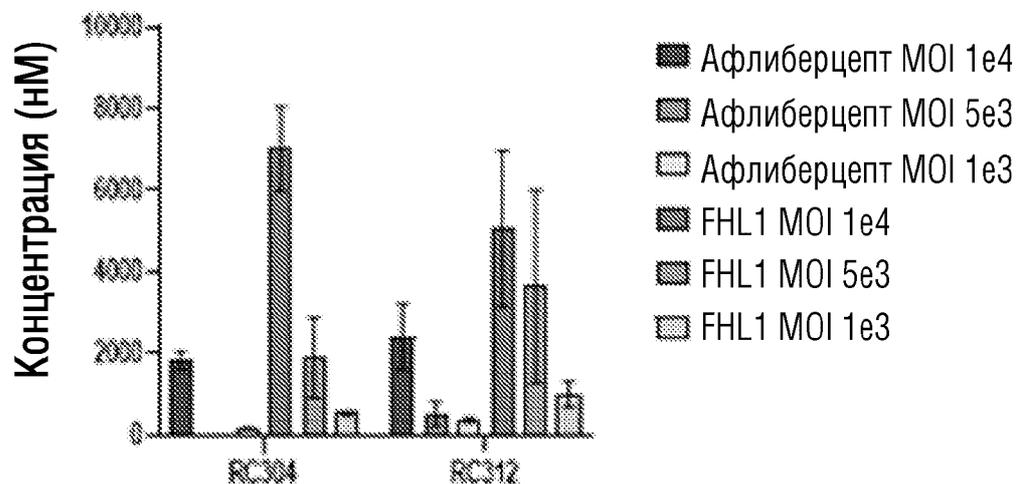
E

Афлиберцепт-CFI векторы

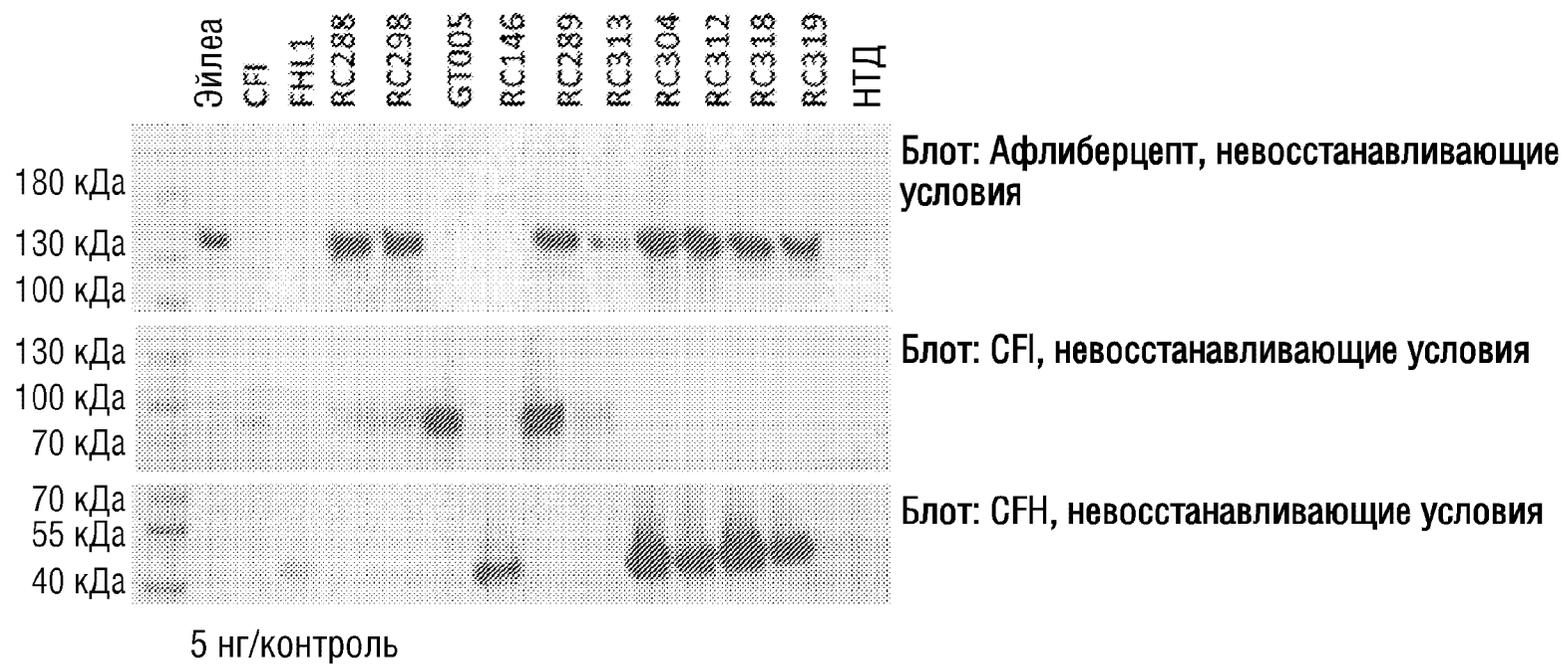


F

Афлиберцепт-FHL1 векторы

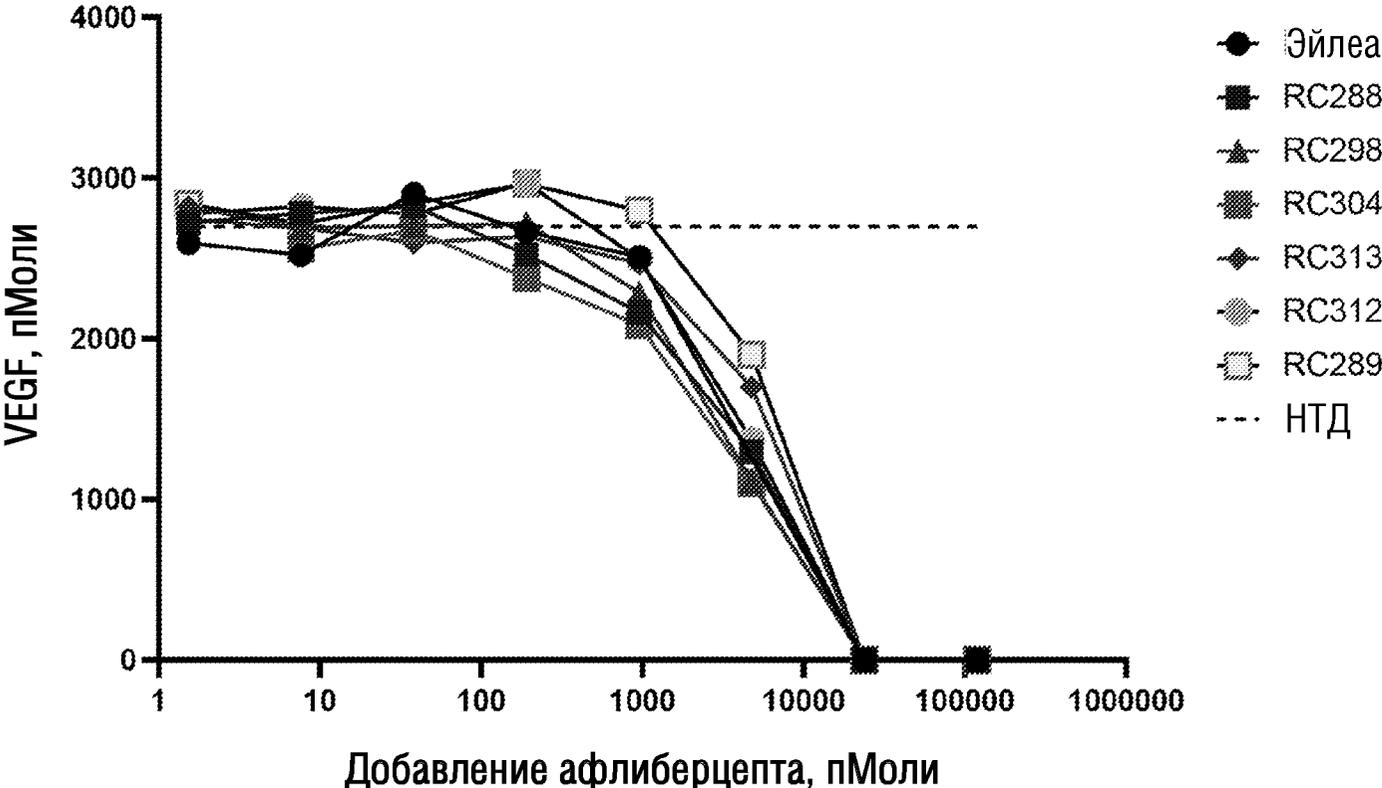


ФИГ.8



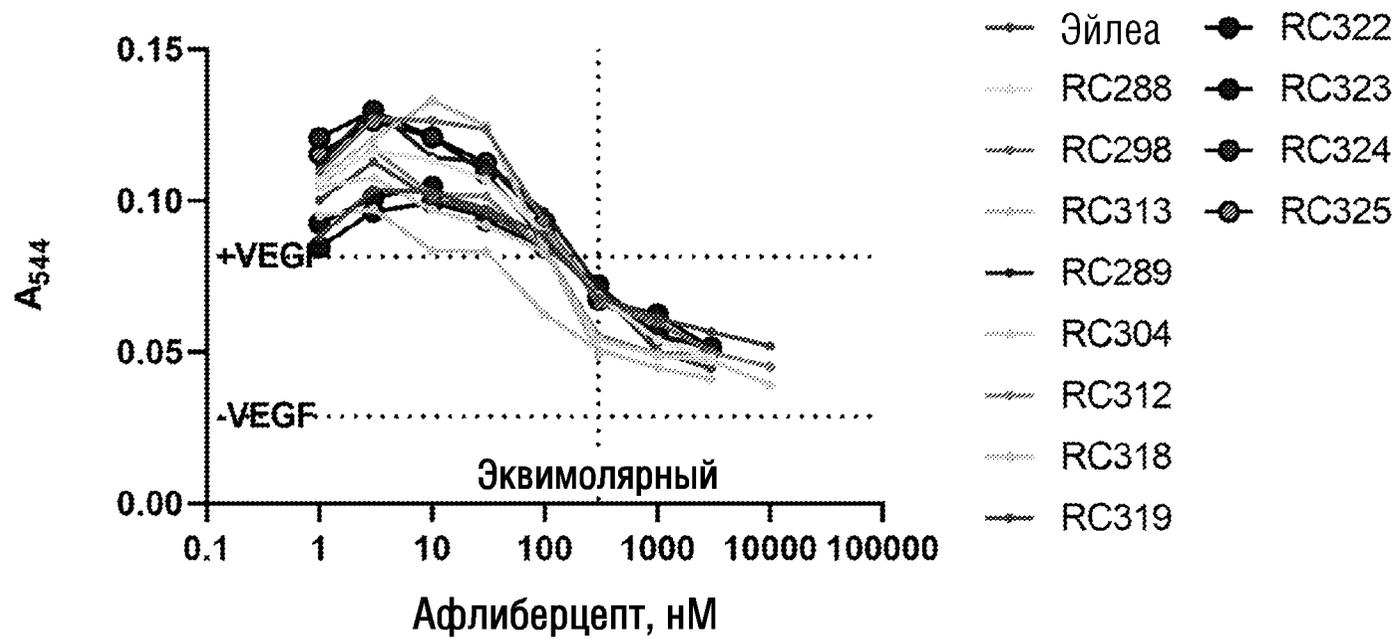
ФИГ.9

пМоли VEGF, обнаруженные после анализа связывания



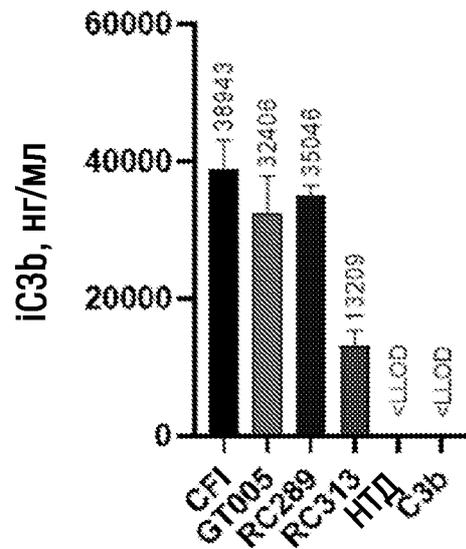
ФИГ.10

Пролиферация HUVEC в присутствии афлиберцепта

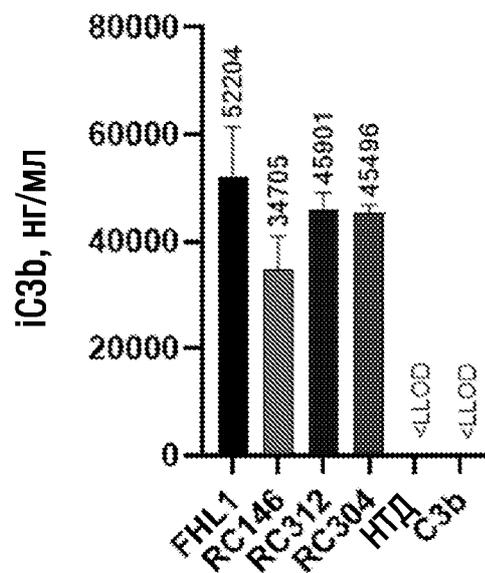


ФИГ.11

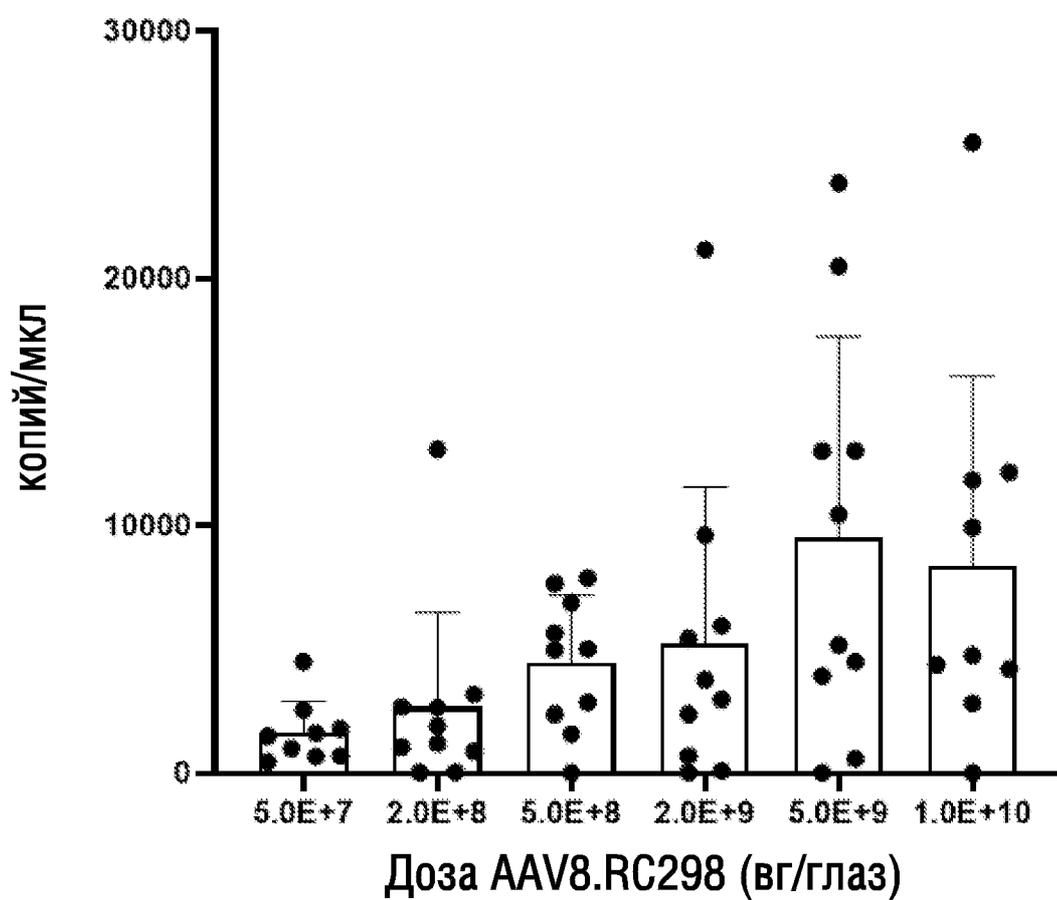
Уровни iC3b после анализа расщепления C3b,
CFI векторы



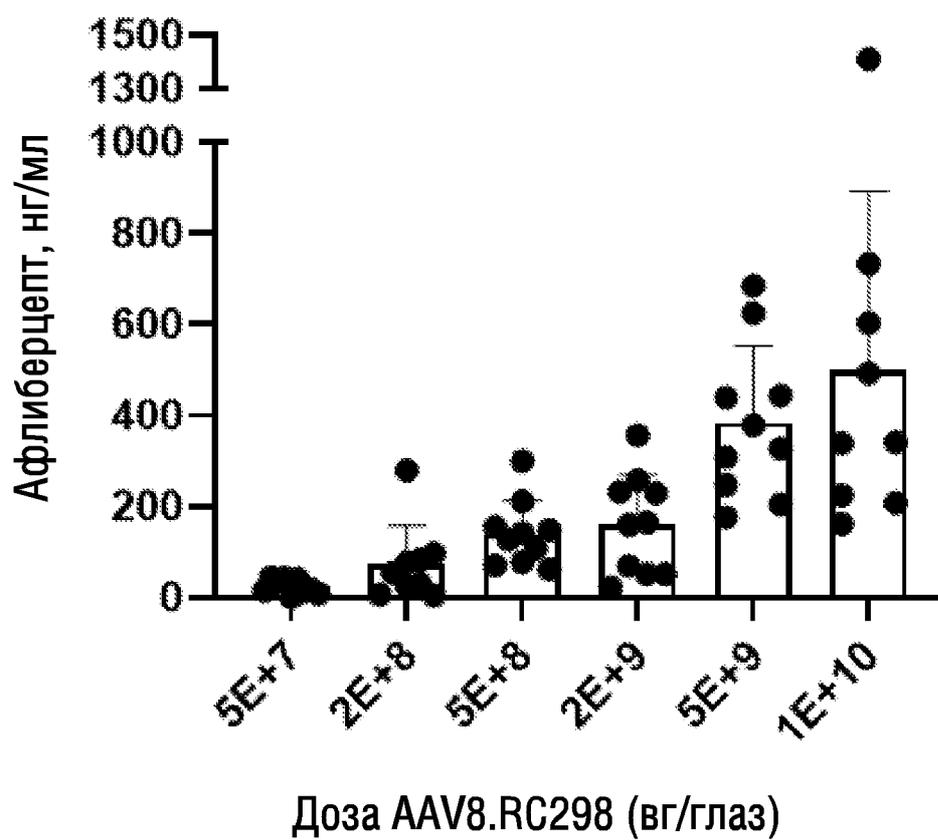
Уровни iC3b после анализа расщепления C3b,
FHL1 векторы



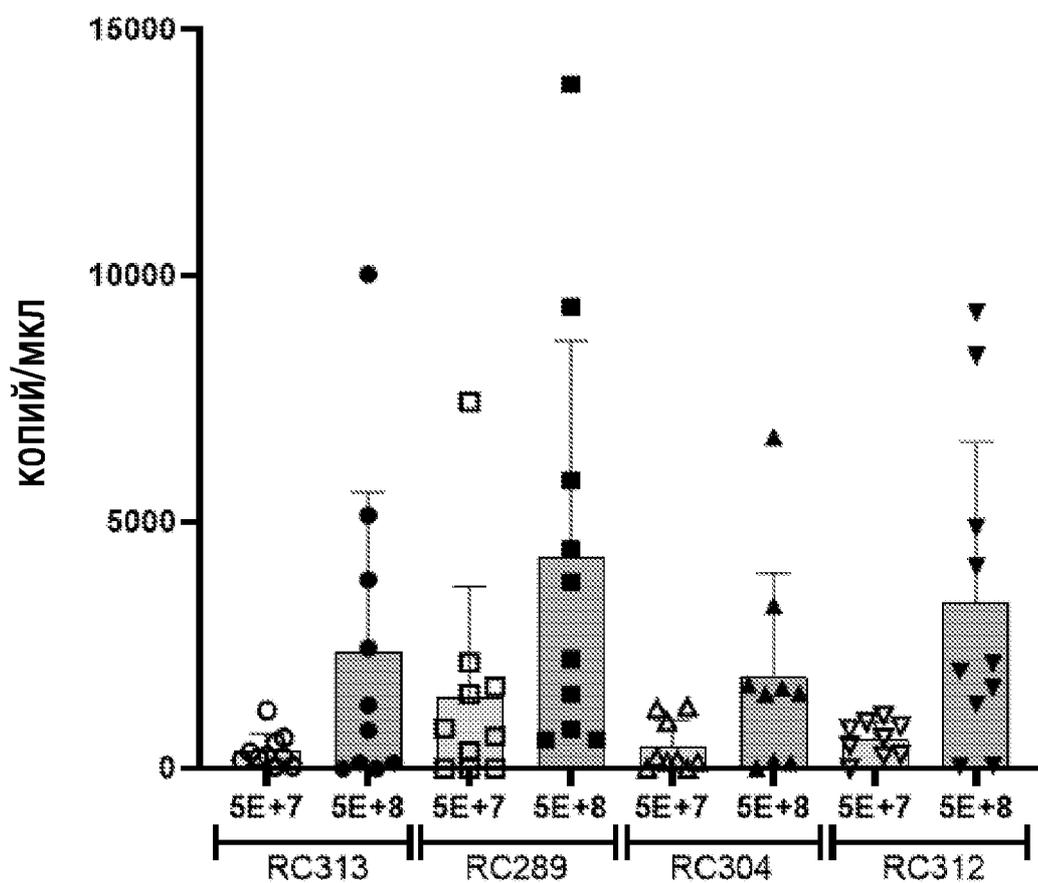
ФИГ.12



ФИГ.13



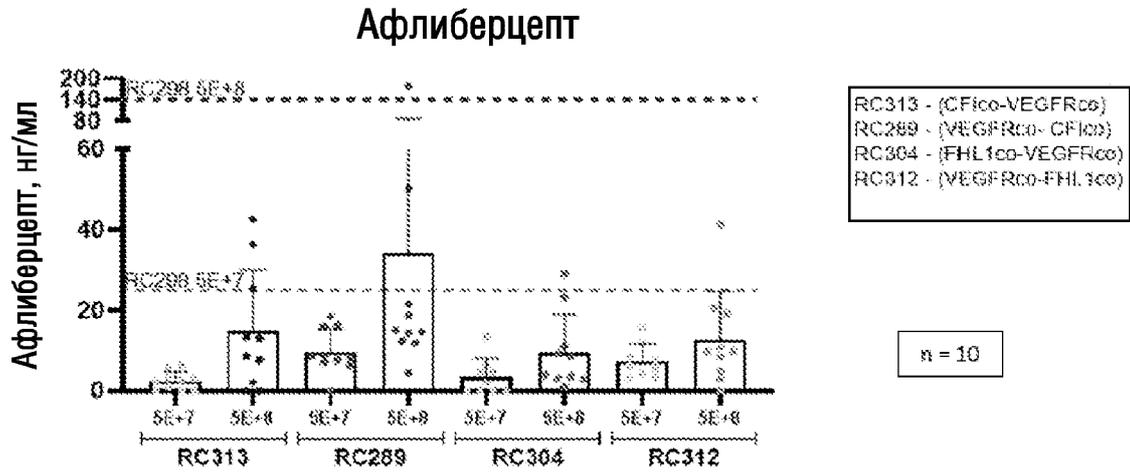
ФИГ.14



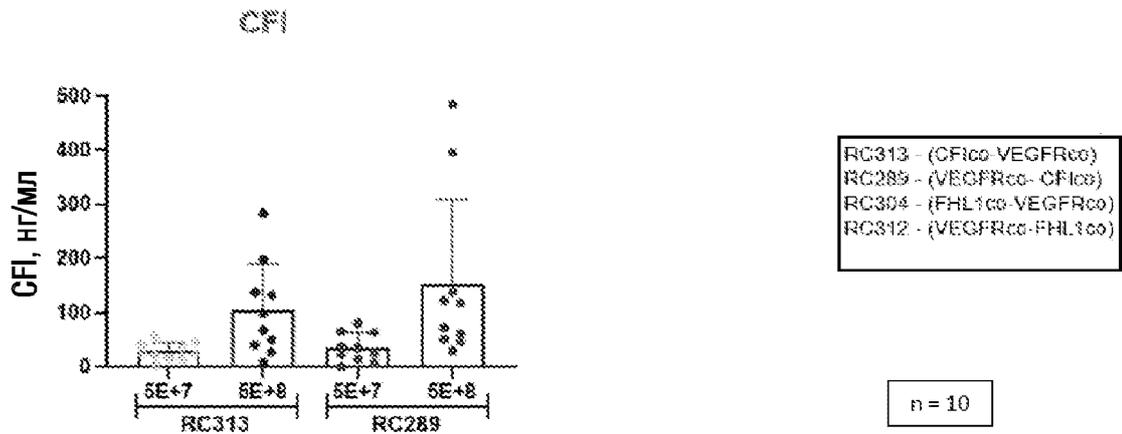
RC313 - (CFIco-VEGFRco)
RC289 - (VEGFRco- CFIco)
RC304 - (FHL1co-VEGFRco)
RC312 - (VEGFRco-FHL1co)

ФИГ.15

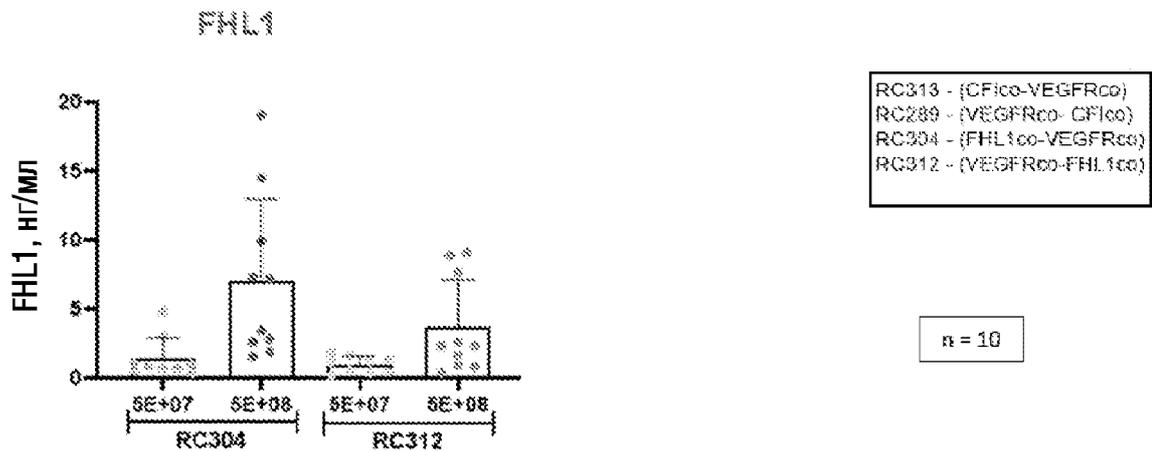
A



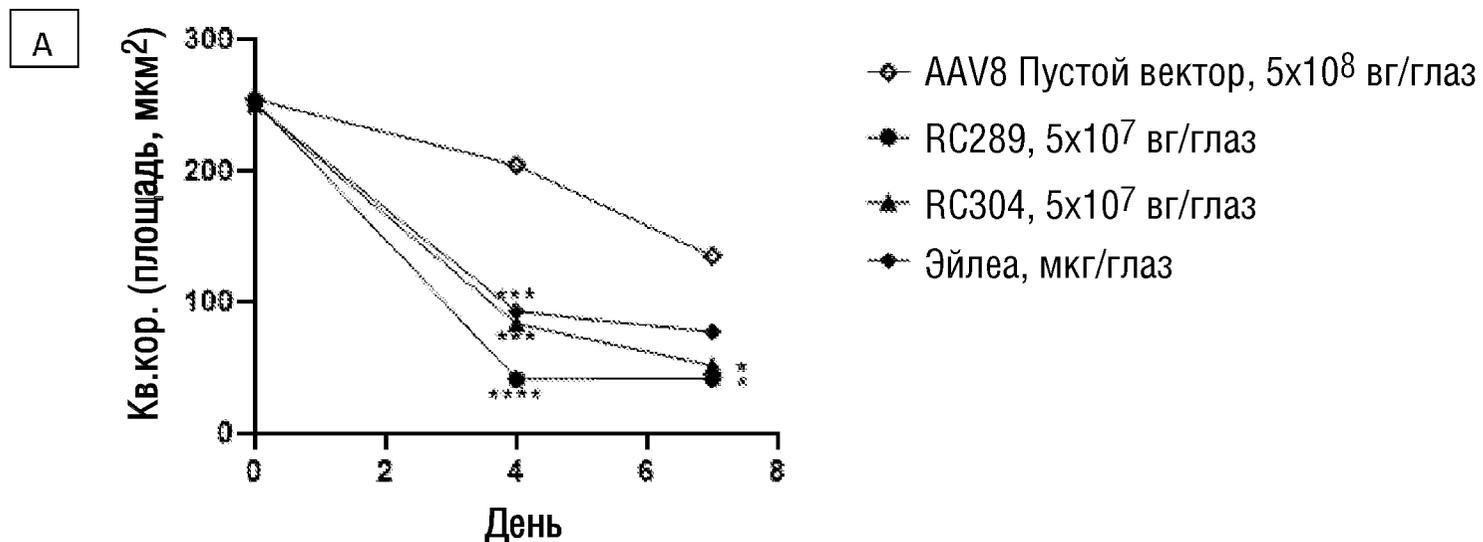
B



C



ФИГ.16



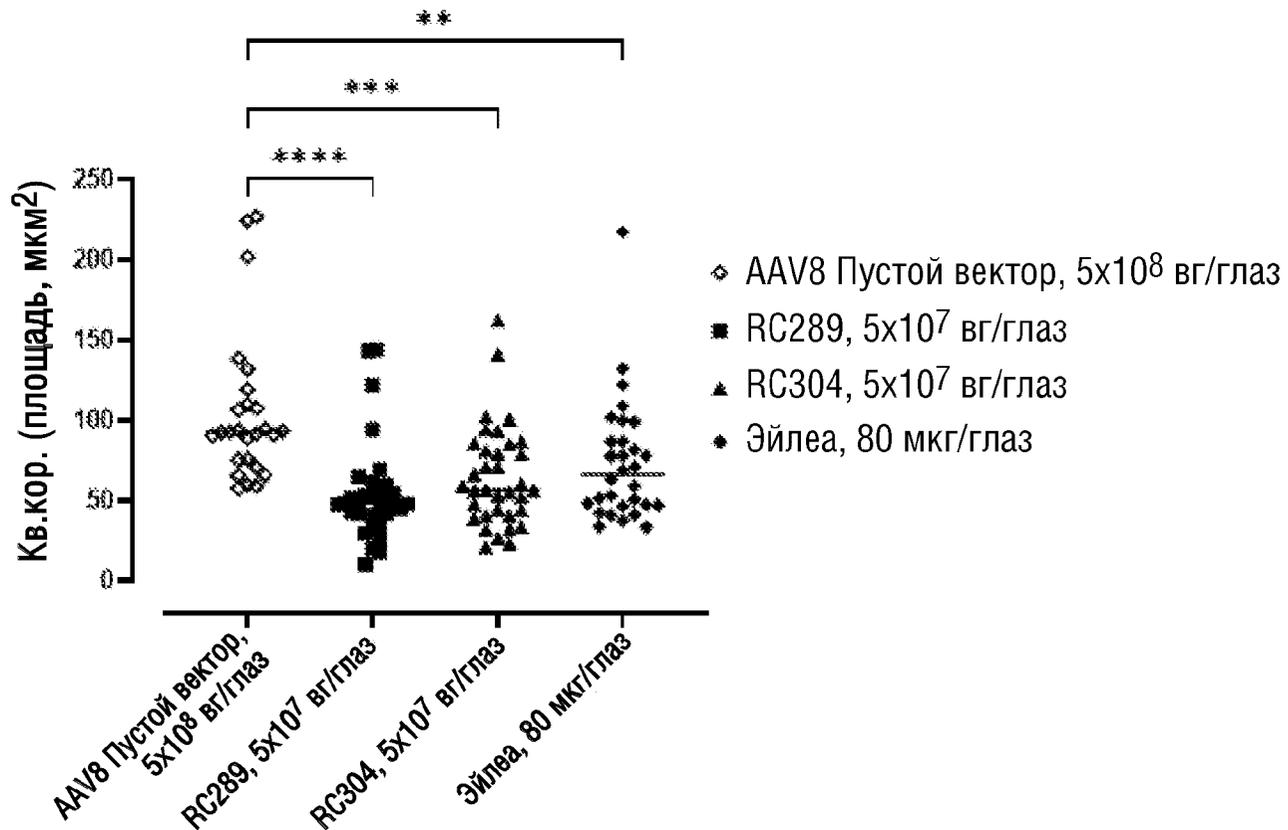
Анализ смешанных эффектов с критерием множественных сравнений Даннета

День 4	Суммарный	P-значение
AAV8 Null vs. RC289	****	<0.0001
AAV8 Null vs. RC304	***	0.0003
AAV8 Null vs. Eyela	***	0.0008

День 7	Суммарный	P-значение
AAV8 Null vs. RC289	*	0.0196
AAV8 Null vs. RC304	*	0.0273
AAV8 Null vs. Eyela	ns	0.2291

ФИГ.16, продолжение

В



Однофакторный дисперсионный анализ	Суммарный	P-значение
AAV8 Null vs. RC289	****	<0.0001
AAV8 Null vs. RC304	***	0.0002
AAV8 Null vs. Эйлеа	**	0.0053