

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202391150** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2023.08.29

(22) Дата подачи заявки
2021.10.29

(51) Int. Cl. *C07K 19/00* (2006.01)
C12N 15/861 (2006.01)
C07K 14/715 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(54) **ВЕКТОРИЗОВАННЫЕ АНТАГОНИСТЫ TNF-АЛЬФА ПРИ
ОФТАЛЬМОЛОГИЧЕСКИХ ПАТОЛОГИЯХ**

(31) **63/107,415**

(32) **2020.10.29**

(33) **US**

(86) **PCT/US2021/057380**

(87) **WO 2022/094295 2022.05.05**

(71) Заявитель:
РИДЖЕНКСБИО ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

**Ван Сюй, Макдугалд Дэвин, Брудер
Джозеф, Лю Е, Данос Оливье, Цяо
Чуньпин, Ли Вэй-Хуа (US)**

(74) Представитель:

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

(57) Предложены способы и композиции для доставки полностью человеческих посттрансляционно модифицированных терапевтических Fc-слитых белков рецептора TNF. Полностью человеческие посттрансляционно модифицированные терапевтические Fc-слитые белки рецептора TNF можно доставлять методами генной терапии, например в виде вектора на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV) в соответствующую ткань. Также предложены способы лечения офтальмологических патологий, таких как неинфекционный увеит, с помощью полностью человеческих посттрансляционно модифицированных терапевтических Fc-слитых белков рецептора TNF.

A1

202391150

202391150

A1

ВЕКТОРИЗОВАННЫЕ АНТАГОНИСТЫ TNF-АЛЬФА ПРИ ОФТАЛЬМОЛОГИЧЕСКИХ ПАТОЛОГИЯХ

Описание

1. ВВЕДЕНИЕ

[0001] Описаны композиции и способы доставки полностью человеческого посттрансляционно модифицированного (чПМ) терапевтического слитого белка рецептора фактора некроза опухоли (TNFR), который связывается с фактором некроза опухоли альфа (TNF- α), субъекту-человеку с диагнозом неинфекционный увеит.

2. УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0002] Было показано, что терапевтические Fc-слитые белки к TNF α эффективны при лечении ряда заболеваний и патологических состояний. Однако, поскольку эти агенты эффективны только в течение короткого периода времени, часто требуются повторные инъекции в течение длительного времени, что создает значительную терапевтическую нагрузку для пациентов.

[0003] Увеит включает группу гетерогенных заболеваний, характеризующихся воспалением увеального тракта. Увеит обычно можно классифицировать по этиологии воспаления как инфекционный или неинфекционный (аутоиммунные заболевания), который может быть связан или не связан с системным заболеванием. Кроме того, увеит может быть классифицирован по анатомическому принципу как передний, промежуточный, задний или панувеит, и они могут иметь острое, хроническое или рецидивирующее течение. Клиническая картина вариабельна, симптомы могут включать нечеткость зрения, светобоязнь, глазную боль и значительное нарушение зрения (Valenzuela et al., Front Pharmacol. 2020; 11: 655).

[0004] Неинфекционный увеит представляет собой серьезное, угрожающее зрению внутриглазное воспалительное заболевание, характеризующееся воспалением сосудистой оболочки (радужной оболочки, цилиарного тела и сосудистой оболочки). Считается, что неинфекционный увеит возникает в результате иммунно-опосредованного ответа на окулярные антигены и является основной причиной необратимой слепоты среди населения трудоспособного возраста в развитых странах. Целью лечения увеита является контроль воспаления, предотвращение рецидивов и сохранение зрения, а также минимизация побочных эффектов лекарственных средств. В настоящее время стандарт лечения неинфекционных увеитов включает назначение кортикостероидов в качестве препаратов первой линии, однако в ряде случаев требуется более агрессивная терапия. К ним относятся

синтетические иммунодепрессанты, такие как антиметаболиты (метотрексат, микофенолата мофетил и азатиоприн), ингибиторы кальциневрина (циклоспорин, такролимус) и алкилирующие агенты (циклофосфамид, хлорамбуцил). У тех пациентов, которые становятся непереносимыми или невосприимчивыми к кортикостероидам и обычному иммуносупрессивному лечению, биологические агенты появились как эффективная терапия увеита у детей и взрослых, основанная на нацеливании на соответствующие иммунологические пути, участвующие в патогенезе заболевания. Применяемая в настоящее время иммуномодулирующая терапия включает ингибирование TNF α , достигаемое с помощью моноклональных антител, таких как инфликсимаб, адалимумаб, голимумаб и цертолизумаб-пегол, или с помощью слитого белка рецептора TNF, этанерцепта. В связи с этим агенты к TNF (инфликсимаб и адалимумаб) показали самые сильные результаты с точки зрения благоприятных исходов. Адалимумаб был одобрен для лечения неинфекционного увеита путем подкожного введения каждые две недели. Когда обычные иммуносупрессивные средства и/или терапевтические средства к TNF- α неэффективны, рекомендуются другие биологические агенты.

[0005] EYS606 кодирует рекомбинантный слитый белок, связывающий рецептор 1 TNF α p55 (TNFR1) с частью Fc молекулы иммуноглобулина IgG1. EYS606 в настоящее время исследуется как невирусная генная терапия для лечения неинфекционного заднего, промежуточного или панuveита. EYS606 вводят посредством электропереноса в цилиарную мышцу пациентов.

[0006] Этанерцепт представляет собой димерный слитый белок, состоящий из двух внеклеточных доменов человеческого рецептора TNF α p75 (TNFR2), слитых с частью Fc молекулы иммуноглобулина IgG1 (TNFR:Fc), и может использоваться для лечения нескольких аутоиммунных воспалительных заболеваний, включая ревматоидный артрит, болезнь Крона и псориатический артрит. Этанерцепт вводят подкожно в дозе 50 мг один раз в неделю или 25 мг два раза в неделю (Valenzuela et al., Front Pharmacol. 2020; 11: 655.).

[0007] Существует потребность в более эффективных средствах для лечения, которые снижают нагрузку на пациентов, страдающих неинфекционным увеитом. Интравитреальные препараты стали многообещающим способом введения лекарственных средств у пациентов с увеитом, поскольку они доставляют большой объем лекарственного средства к целевым тканям, устраняя риск системной токсичности. Уменьшение или устранение необходимости в периодическом офтальмологическом введении уменьшит нагрузку на пациента и позволит улучшить терапию.

3. СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0008] Биологические ингибиторы, доставляемые с помощью генной терапии, имеют несколько преимуществ по сравнению с введенными или инфузируемыми биологическими ингибиторами, которые со временем рассеиваются, приводя к пиковым и минимальным уровням. Устойчивая экспрессия биологического ингибитора - продукта трансгена, в отличие от многократных инъекций биологического ингибитора, позволяет обеспечить более постоянный уровень биологического ингибитора в месте действия и является менее рискованным и более удобным для пациентов, поскольку необходимо делать меньше инъекций. Более того, биологические ингибиторы, экспрессируемые трансгенами, посттрансляционно модифицируются иным образом, чем биологические ингибиторы, которые вводятся напрямую, из-за разницы в микроокружении, присутствующей во время и после трансляции. Без привязки к какой-либо конкретной теории, это приводит к получению биологических ингибиторов, которые имеют разные характеристики диффузии, биоактивности, распределения, аффинности, фармакокинетики и иммуногенности, так что антитела, доставленные к месту действия, являются «биопрепаратами с улучшенными характеристиками» по сравнению с непосредственно введенными биологическими препаратами. Системное введение, такое как экспрессия из депо в печени, или, кроме того, локализованная доставка терапевтического средства в ткань глаза может уменьшить воздействие терапевтического средства на субъекта и снизить риск потенциальных неблагоприятных эффектов. Соответственно, в данном документе предусмотрены композиции и способы генной терапии анти-TNF α , например, генной терапии рекомбинантным AAV, которые предназначены для нацеливания на глаз и создания депо трансгенов для экспрессии Fc-слитых белков к TNF α (TNFR:Fc), в частности этанерцепт (TNFR2:Fc) и EYS606 (TNFR1:Fc), которые приводят к терапевтически эффективным или профилактическим уровням биологического ингибитора в глазах в течение 20 дней, 30 дней, 40 дней, 50 дней, 60 дней или 90 дней после введения композиции rAAV.

[0009] Описаны композиции и способы для системной доставки Fc-слитого белка к TNF α пациенту (субъекту-человеку), у которого диагностирован неинфекционный увеит или другое патологическое состояние, при котором показано лечение терапевтическим Fc-слитым белком к TNF α . Доставка может быть успешно осуществлена с помощью генной терапии, например, путем введения вирусного вектора или другой конструкции для экспрессии ДНК, кодирующей терапевтический Fc-слитый белок к TNF α , субъекту, у которого диагностировано патологическое состояние, при котором показано лечение с помощью терапевтического Fc-слитого белка к TNF α для создания постоянного депо в глазу или, в альтернативных вариантах осуществления, в печени и/или мышце пациента, которое

непрерывно поставляет чПМ Fc-слитый белок к TNF α , например, человеческий гликозилированный продукт трансгена, в соответствующие ткани глаза (в том числе через кровоток) субъекта, где Fc-слитый белок к TNF α оказывает свой терапевтический или профилактический эффект.

[0010] Рекомбинантный вектор, используемый для доставки трансгена, включает нереплицирующиеся рекомбинантные аденоассоциированные вирусные векторы («гAAV»). В вариантах осуществления тип AAV обладает тропизмом к глазу, например, подтип AAV8, подтип AAV3B, подтип AAV2.7m8 или AAVrh73 AAV. Однако можно использовать другие вирусные векторы, включая, но не ограничиваясь ими, лентивирусные векторы; векторы на основе вируса осповакцины или невирусные экспрессирующие векторы, называемые конструкциями «голой ДНК». Экспрессия трансгена может контролироваться конститутивными или тканеспецифичными элементами регуляции экспрессии, в частности элементами, которые являются специфичными для ткани глаза элементами регуляции, например, одним или более элементами из таблицы 1 или, альтернативно, из таблицы 1a. Конструкции также могут содержать сигнальный или лидерный пептид, который направляет секрецию экспрессированного Fc-слитого белка к TNF α , например, пептид из таблицы 2 или таблиц 3 или 4.

[0011] В определенных вариантах осуществления чПМ Fc-слитый белок к TNF α , кодируемый трансгеном, может включать, помимо прочего, слитые белки TNFR:Fc, которые связываются с TNF α , в частности, этанерцепт (или любая его версия биоаналог) или EYS606, см., например, **Фиг. 2A и 2B**.

[0012] Конструкции для генной терапии для терапевтического Fc-слитого белка к TNF α сконструированы таким образом, что растворимый TNFR (TNFR1 или TNFR2), слитый с частью Fc, экспрессируется в виде димерного слитого белка (SEQ ID NO: 10 и 12).

[0013] Кроме того, Fc-слитые белки к TNF α , экспрессируемые из трансгенов *in vivo*, вряд ли будут содержать продукты деградации, связанные с биологическими препаратами, полученными с помощью рекомбинантных технологий, таких как агрегация белков и окисление белков. Агрегация является проблемой, связанной с получением и хранением белка из-за высокой концентрации белка, поверхностного взаимодействия с производственным оборудованием и контейнерами и очистки с помощью определенных буферных систем. Эти условия, которые способствуют агрегации, отсутствуют в экспрессии трансгена в генной терапии. Окисление, такое как окисление метионина, триптофана и гистидина, также связано с производством и хранением белка и вызвано стрессовыми условиями культивирования клеток, контактом металла и воздуха, а также примесями в буферах и эксципиентов. Белки, экспрессируемые трансгенами *in vivo*, также могут

окисляться в стрессовых условиях. Однако люди и многие другие организмы имеют систему антиоксидантной защиты, которая не только снижает окислительный стресс, но иногда также восстанавливает и/или обращает вспять процесс окисления. Таким образом, белки, продуцируемые *in vivo*, вряд ли находятся в окисленной форме. И агрегация, и окисление могут влиять на активность, фармакокинетику (клиренс) и иммуногенность.

[0014] Продукция чПМ Fc-слитых белков к TNF α в глазу человека должно привести к получению молекулы «с улучшенными характеристиками» для лечения заболевания с помощью генной терапии, например, путем введения вирусного вектора или другой конструкции для экспрессии ДНК, кодирующей чПМ слитый белок к TNF α пациенту (субъекту-человеку), у которого диагностировано заболевание, для которого показан этот Fc-слитый белок, для создания постоянного депо у субъекта, которое непрерывно поставляет человеческий гликозилированный сульфатированный продукт трансгена, продуцируемый трансдуцированными клетками субъекта. Конструкция кДНК для чПМ Fc-слитого белка к TNF α должна включать сигнальный пептид, который обеспечивает надлежащий ко- и посттрансляционный процессинг (гликозилирование и сульфатирование белка) трансдуцированными клетками человека.

[0015] В качестве альтернативы или дополнительного лечения к генной терапии чПМ Fc-слитого белка к TNF α можно продуцировать в линиях клеток человека с помощью технологии рекомбинантной ДНК, а гликопротеин можно вводить пациентам.

[0016] Виды комбинированной терапии, включающие доставку чПМ Fc-слитого белка к TNF α пациенту, сопровождаемые введением других доступных средств для лечения, охватываются способами, представленными в данном документе. Дополнительные средства для лечения можно вводить до, одновременно или после генной терапии. Такие дополнительные средства для лечения могут включать, но не ограничиваются ими, совместную терапию терапевтическими Fc-слитыми белками к TNF α или мкАт к TNF α .

[0017] Также представлены способы производства вирусных векторов, в частности вирусных векторов на основе AAV. В конкретных вариантах осуществления представлены способы получения рекомбинантных AAV, включающие культивирование клетки-хозяина, содержащей искусственный геном, содержащий цис-кассету экспрессии, фланкированную ITR AAV, при этом цис-кассета экспрессии содержит трансген, кодирующий терапевтическое антитело, функционально связанный с элементами контроля экспрессии, которые будут контролировать экспрессию трансгена в клетках человека; транс-кассету экспрессии без ITR AAV, при этом транс-кассета экспрессии кодирует белок гер и капсидный белок AAV, функционально связанный с элементами контроля экспрессии, которые управляют экспрессией гер и капсидных белков AAV в клетке-хозяине в культуре и

обеспечивают белки гер и сар в транс-расположении; достаточное функционирование хелпера аденовируса для обеспечения репликации и упаковки искусственного генома капсидными белками AAV; и выделение рекомбинантного AAV, инкапсулирующего искусственный геном, из культуры клеток.

[0018] Предложены композиции, включающие векторы гAAV, которые содержат оптимизированную кассету экспрессии, содержащую промотор, специфичный для фоторецептора, или другой подходящий промотор, включая промотор CAG, промотор Best1/GRK (или другой промотор, представленный в таблице 1 или таблице 1a (и кодон-оптимизированный и CpG-истощенный трансген, который экспрессирует трансген, например, растворимый TNFR (TNFR1 или TNFR2) и домен Fc (включая шарнирный домен, домены CH2 и CH3) терапевтического слитого белка Fc к TNF α , включая этанерцепт и EYS606. Также представлены способы введения и производства. В частности, предложены композиции и способы, включающие гAAV, содержащие конструкцию CAG.etanercept или U1a.Vh4i.etanercept.scAAV (см. таблицу 7).

[0019] Фармацевтические композиции, подходящие для введения людям, включают суспензию рекомбинантного вектора в буфере для состава, содержащем физиологически совместимый водный буфер, поверхностно-активное вещество и необязательные эксципиенты.

3.1 ИЛЛЮСТРАТИВНЫЕ ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

1. Фармацевтическая композиция для лечения неинфекционного увеита у субъекта-человека, нуждающегося в этом, содержащая вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV), имеющий:

- (a) вирусный капсид, имеющий тропизм к клеткам ткани глаза; и
- (b) искусственный геном, содержащий кассету экспрессии, фланкированную внутренними тандемными повторами (ITR) AAV, где кассета экспрессии содержит трансген, кодирующий слитый белок Fc к TNF α , функционально связанный с одной или более регуляторными последовательностями, которые контролируют экспрессию трансгена в клетках глаза человека;

при этом указанный вектор AAV составлен для субретинального, интравитреального, интраназального, интракамерального, супрахориоидального или системного введения указанному субъекту-человеку.

2. Фармацевтическая композиция по пункту 1, отличающаяся тем, что Fc-слитый белок к TNF α содержит растворимую внеклеточную часть рецептора TNF α человека типа I (TNFR1) или типа II (TNFR2), ковалентно связанную пептидной связью с полипептидом, содержащим домен Fc тяжелой цепи иммуноглобулина.

3. Фармацевтическая композиция по пункту 1 или 2, отличающаяся тем, что вирусный капсид имеет по меньшей мере 95% идентичности с аминокислотной последовательностью серотипа 1 (AAV1), серотипа 2 (AAV2), серотипа AAV2.7m8 (AAV2.7m8), серотипа 3 (AAV3), серотипа 3B (AAV3B), серотипа 4 (AAV4), серотипа 5 (AAV5), серотипа 6 (AAV6), серотипа 7 (AAV7), серотипа 8 (AAV8), серотипа rh8 (AAVrh8), серотипа 9 (AAV9), серотипа 9e (AAV9e), серотипа rh10 (AAVrh10), серотипа rh20 (AAVrh20), серотипа rh39 (AAVrh39), серотипа hu.37 (AAVhu.37), серотипа rh73 (AAVrh73), серотипа rh74 (AAVrh74), серотипа hu51 (AAV.hu51), серотипа hu21 (AAV.hu21), серотипа hu12 (AAV.hu12), или серотипа hu26 (AAV.hu26) AAV.
4. Фармацевтическая композиция по любому из пунктов 1-3, отличающаяся тем, что капсид AAV представляет собой AAV8, AAV3B, AAV2.7m8 или AAVrh73.
5. Фармацевтическая композиция по пунктам 1-4, отличающаяся тем, что клетка ткани глаза представляет собой клетку роговицы, клетку радужной оболочки, клетку цилиарного тела, клетку шлеммова канала, клетку трабекулярной сети, клетку сетчатки, клетку ткани ПЭС-хориоидеи или клетку зрительного нерва.
6. Фармацевтическая композиция по пунктам 1-5, отличающаяся тем, что регуляторная последовательность включает регуляторную последовательность из таблицы 1 или 1b.
7. Фармацевтическая композиция по пункту 5, отличающаяся тем, что регуляторная последовательность представляет собой промотор родопсинкиназы человека (GRK1) (SEQ ID NO: 54 или 117), промотор аррестина колбочек мыши (CAR) (SEQ ID NO: 114-116), промотор красного опсина человека (RedO) (SEQ ID NO:112), промотор CB (SEQ ID NO:159), промотор CBLong (SEQ ID NO:160) или промотор Best1/GRK (SEQ ID NO:161).
8. Фармацевтическая композиция по любому из пунктов 1-7, отличающаяся тем, что трансген кодирует сигнальную последовательность на N-конце Fc-слитого белка к TNF α , которая направляет секрецию и посттрансляционную модификацию в указанных клетках глаза человека.
9. Фармацевтическая композиция по пункту 8, в которой указанная сигнальная последовательность представляет собой MYRMQLLLLLIALSLALVTNS (SEQ ID NO: 62) или сигнальную последовательность из таблицы 2, 3 или 4.
10. Фармацевтическая композиция по любому из пунктов 1-8, отличающаяся тем, что трансген имеет структуру от N-конца к C-концу: сигнальная последовательность – растворимый внеклеточный домен TNFR – шарнирная область – домен Fc – поли-A.

11. Композиция по пункту 10, отличающаяся тем, что трансген дополнительно содержит сайт расщепления тромбином SEQ ID NO:8 на С-конце растворимого внеклеточного домена TNFR.
12. Фармацевтическая композиция по любому из пунктов 1-11, отличающаяся тем, что Fc-слитый белок к TNF α экспрессируется в виде димерного слитого белка.
13. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-12, отличающаяся тем, что Fc-слитый белок к TNF α представляет собой этанерцепт или EYS606.
14. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-13, отличающаяся тем, что указанный трансген содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 15-18.
15. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-14, отличающаяся тем, что Fc-слитый белок к TNF α имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10 или 12.
16. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-15, отличающаяся тем, что Fc-слитый белок к TNF α представляет собой гипергликозилированный мутант или при этом полипептид Fc Fc-слитого белка к TNF α является гликозилированным или агликозилированным.
17. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-16, отличающаяся тем, что домен Fc представляет собой домен IgG1-Fc.
18. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-17, отличающаяся тем, что искусственный геном является самокомплементарным.
19. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-18, отличающаяся тем, что искусственный геном представляет собой конструкцию CAG.etanercept (SEQ ID NO: 15 или 16) или mU1a.Vh4i.etanercept.scAAV (SEQ ID NO: 17 или 18).
20. Композиция, содержащая вектор аденоассоциированного вируса (AAV), имеющий:
 - a. вирусный капсид AAV, который необязательно имеет по меньшей мере 95% идентичности с аминокислотной последовательностью серотипа 1 (AAV1), серотипа 2 (AAV2), серотипа AAV2.7m8 (AAV2.7m8), серотипа 3 (AAV3), серотипа 3B (AAV3B), серотипа 4 (AAV4), серотипа 5 (AAV5), серотипа 6 (AAV6), серотипа 7 (AAV7), серотипа 8 (AAV8), серотипа rh8 (AAVrh8), серотипа 9 (AAV9), серотипа 9e (AAV9e), серотипа rh10 (AAVrh10), серотипа rh20 (AAVrh20), серотипа rh39 (AAVrh39), серотипа hu.37 (AAVhu.37), серотипа rh73 (AAVrh73), серотипа rh74 (AAVrh74), серотипа hu51 (AAV.hu51), серотипа hu21 (AAV.hu21), серотипа hu12 (AAV.hu12), или серотипа hu26 (AAV.hu26) AAV.
 - b. искусственный геном, содержащий кассету экспрессии, фланкированную инвертированными концевыми повторами (ITR) AAV, где кассета экспрессии

содержит трансген, кодирующий Fc-слитый белок к TNF- α , содержащий растворимый человеческий внеклеточный домен рецептора TNF α типа I (TNFR1) или типа II (TNFR2), ковалентно связанный пептидной связью с полипептидом, содержащим домен Fc тяжелой цепи иммуноглобулина, функционально связанный с одной или более регуляторными последовательностями, которые способствуют экспрессии трансгена в клетках ткани глаза человека;

при этом трансген кодирует сигнальную последовательность на N-конце указанного Fc-слитого белка к TNF α , которая направляет секрецию и посттрансляционную модификацию указанного Fc-слитого белка к TNF α в клетках ткани глаза.

21. Композиция по пункту 20, отличающаяся тем, что трансген дополнительно содержит сайт расщепления тромбином SEQ ID NO:8 на C-конце растворимого человеческого внеклеточного домена TNFR.
22. Композиция по любому из пунктов 20 или 21, отличающаяся тем, что Fc-слитый белок к TNF α имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10 или 12.
23. Композиция по пп. 20-22, отличающаяся тем, что Fc-слитый белок к TNF α представляет собой этанерцепт или EYS606.
24. Композиция по пунктам 20-23, отличающаяся тем, что клетка ткани глаза представляет собой клетку роговицы, клетку радужной оболочки, клетку цилиарного тела, клетку шлеммова канала, клетку трабекулярной сети, клетку сетчатки, клетку ткани ПЭС-хориоидеи или клетку зрительного нерва.
25. Композиция по пунктам 20-24, отличающаяся тем, что указанный трансген содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 13 или 14.
26. Композиция по пунктам 20-25, отличающаяся тем, что указанная сигнальная последовательность представляет собой MYRMQLLLLIASLALVTNS (SEQ ID NO: 62) или сигнальную последовательность из таблиц 2, 3 или 4.
27. Композиция по любому из пп. 20-26, отличающаяся тем, что искусственный геном является самокомплементарным.
28. Композиция по любому из пп. 20-27, отличающаяся тем, что искусственный геном представляет собой конструкцию CAG.etanercept (SEQ ID NO: 15) или mU1a.Vh4i.etanercept.scAAV (SEQ ID NO: 17).

Способ лечения

29. Способ лечения неинфекционного увеита у субъекта-человека, нуждающегося в этом, включающий субретинальное, интравитреальное, интраназальное, интракамеральное, супрахориоидальное или системное введение субъекту терапевтически эффективного количества композиции, содержащей рекомбинантный AAV, содержащий трансген,

кодирующий Fc-слитый белок к TNF α , функционально связанный с одной или более регуляторными последовательностями, которые контролируют экспрессию трансгена в клетках ткани глаза.

30. Способ лечения неинфекционного увеита у субъекта-человека, нуждающегося в этом, включающий: субретинальное, интравитреальное, интраназальное, интракамеральное, супрахориоидальное или системное введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества рекомбинантного нуклеотидного вектора экспрессии, содержащего трансген, кодирующий Fc-слитый белок к TNF α , функционально связанный с одной или более регуляторными последовательностями, которые регулируют экспрессию трансгена в клетках ткани глаза человека, так что образуется депо, которое высвобождает человеческую посттрансляционно модифицированную (чПМ) форму Fc-слитого белка к TNF α .
31. Способ по пунктам 29 и 30, отличающийся тем, что клетка ткани глаза представляет собой клетку роговицы, клетку радужной оболочки, клетку цилиарного тела, клетку шлеммова канала, клетку трабекулярной сети, клетку сетчатки, клетку ткани ПЭС-хориоидеи или клетку зрительного нерва.
32. Способ по пунктам 29-31, отличающийся тем, что указанный Fc-слитый белок к TNF α содержит растворимый внеклеточный домен рецептора TNF α типа I (TNFR1) или типа II (TNFR2), ковалентно связанный с доменом Fc IgG.
33. Способ по пунктам 29-32, отличающийся тем, что указанный трансген представляет собой этанерцепт или EYS606.
34. Способ по пунктам 29-33, отличающийся тем, что указанный трансген имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 15-17.
35. Способ по пунктам 29-34, отличающийся тем, что рекомбинантный нуклеотидный вектор экспрессии упакован в gAAV, содержащий вирусный капсид, при этом вирусный капсид имеет по меньшей мере 95% идентичности с аминокислотной последовательностью AAV серотипа 1 (AAV1), серотипа 2 (AAV2), серотипа AAV2.7m8, серотипа 3 (AAV3), серотипа 3B (AAV3B), серотипа 4 (AAV4), серотипа 5 (AAV5), серотипа 6 (AAV6), серотипа 7 (AAV7), серотипа 8 (AAV8), серотипа rh8 (AAVrh8), серотипа 9 (AAV9), серотипа 9e (AAV9e), серотипа rh10 (AAVrh10), серотипа rh20 (AAVrh20), серотипа rh39 (AAVrh39), серотипа hu.37 (AAVhu.37), серотипа rh73 (AAVrh73), или серотипа rh74 (AAVrh74), серотипа hu51 (AAV.hu51), серотипа hu21 (AAV.hu21), серотипа hu12 (AAV.hu12), или серотипа hu26 (AAV.hu26).

36. Способ по любому из пунктов 29, 31-35, отличающийся тем, что капсид AAV представляет собой AAV8, AAV2.7m8, AAV3B или AAVrh73.
37. Способ по любому из пунктов 29-36, отличающийся тем, что регуляторная последовательность включает регуляторную последовательность из таблицы 1 или 1a.
38. Способ по пункту 37, отличающийся тем, что регуляторная последовательность представляет собой промотор родопсинкиназы человека (GRK1) (SEQ ID NO:54 или 117), промотор аррестина колбочек мыши (CAR) (SEQ ID NO:114-116), промотор красного опсина человека (RedO) (SEQ ID NO:112), промотор CB (SEQ ID NO: 159), промотор CBLong (SEQ ID NO: 160) или промотор Best1/GRK (SEQ ID NO: 161).
39. Способ по любому из пунктов 29-38, отличающийся тем, что трансген кодирует сигнальную последовательность на N-конце Fc-слитого белка к TNF α , которая направляет секрецию и посттрансляционную модификацию в указанных клетках ткани глаза человека.
40. Способ по пункту 39, отличающийся тем, что указанная сигнальная последовательность представляет собой MYRMQLLLLIASLALVTNS (SEQ ID NO: 62) или сигнальную последовательность из таблиц 2, 3 или 4
41. Способ по любому из пунктов 25-40, отличающийся тем, что трансген имеет структуру: сигнальная последовательность – растворимый внеклеточный домен TNFR 9 человека (тип 1 или тип 2) – шарнирная область – домен Fc – поли-A.
42. Способ по пункту 41, отличающийся тем, что трансген дополнительно содержит сайт расщепления тромбином, имеющий SEQ ID NO:8 на C-конце растворимого внеклеточного домена TNFR человека.
43. Способ по любому из пунктов 29-42, отличающийся тем, что Fc-слитый белок к TNF α представляет собой гипергликозилированный мутант или при этом домен Fc Fc-слитого белка к TNF α является гликозилированным или агликозилированным.
44. Способ по любому из пунктов 29-43, отличающийся тем, что Fc-слитый белок к TNF α содержит альфа-2,6-сиалилированный гликан.
45. Способ по любому из пунктов 29-44, отличающийся тем, что Fc-слитый белок к TNF α является гликозилированным, но не содержит обнаруживаемый NeuGc и/или α -Gal.
46. Способ по любому из пунктов 29-45, отличающийся тем, что Fc-слитый белок к TNF α имеет сульфатирование тирозина.
47. Способ по любому из пунктов 29-46, отличающийся тем, что продуцирование указанной чПМ формы Fc-слитого белка к TNF α подтверждается путем трансдукции

клеток глаза человека в культуре указанным рекомбинантным нуклеотидным вектором экспрессии и экспрессии указанного Fc-слитого белка к TNF α .

48. Способ по пунктам 29 или 47, отличающийся тем, что терапевтически эффективное количество определяется как достаточное для улучшения остроты зрения с максимальной коррекцией (BCVA) на ≥ 2 строки ETDRS или увеличения logMAR, снижения воспалительной активности передней и задней камеры в соответствии с классификацией SUN и/или снижения степени помутнения стекловидного тела.
49. Способ по любому из пп. 29-48, отличающийся тем, что gAAV является самокомплементарным.
50. Способ по любому из пп. 29-49, отличающийся тем, что трансген находится в составе конструкции CAG.etanercept (SEQ ID NO: 15 или 16) или mU1a.Vh4i.etanercept.scAAV (SEQ ID NO: 17 или 18).

Способы производства

51. Способ получения рекомбинантных AAV, включающий:

(a) культивирование клетки-хозяина, содержащей:

- (i) искусственный геном, содержащий *цис*-кассету экспрессии, фланкированную ITR AAV, при этом *цис*-кассета экспрессии содержит трансген, кодирующий Fc-слитый белок к TNF α , причем Fc-слитый белок к TNF α содержит растворимую внеклеточную часть рецептора TNF α человека типа I (TNFR1) или типа II (TNFR2), ковалентно связанную пептидной связью с полипептидом, содержащим домен Fc тяжелой цепи иммуноглобулина, функционально связанный с одной или более регуляторными последовательностями, которые способствуют экспрессии трансгена в клетках ткани глаза человека;
- (ii) *транс*-кассету экспрессии, лишенную ITR AAV, где транс-кассета экспрессии кодирует гер AAV и капсидный белок AAV, функционально связанную с элементами контроля экспрессии, которые управляют экспрессией гер AAV и капсидного белка AAV в клетке-хозяине в культуре и обеспечивает гер AAV и капсидный белок AAV в *транс*-расположении; при этом капсид имеет тропизм к тканям глаза;
- (iii) достаточное функционирование хелпера аденовируса для обеспечения репликации и упаковки искусственного генома капсидным белком AAV;

и

(b) выделение рекомбинантного AAV, инкапсулирующего искусственный геном, из культуры клеток.

52. Способ по пункту 51, отличающийся тем, что клетка ткани глаза представляет собой клетку роговицы, клетку радужной оболочки, клетку цилиарного тела, клетку шлеммова канала, клетку трабекулярной сети, клетку сетчатки, клетку ткани ПЭС-хориоидеи или клетку зрительного нерва.
53. Способ по пунктам 51 или 52, отличающийся тем, что трансген кодирует этанерцепт или EYS606, при этом капсидный белок AAV представляет собой капсидный белок gAAV согласно варианту осуществления 1, при этом указанный капсидный белок происходит по меньшей мере из одного серотипа AAV серотипа 1 (AAV1), серотипа 2 (AAV2), серотипа 2.7m8, серотипа 3 (AAV3), серотипа 3B (AAV3B), серотипа 4 (AAV4), серотипа 5 (AAV5), серотипа 6 (AAV6), серотипа 7 (AAV7), серотипа 8 (AAV8), серотипа rh8 (AAVrh8), серотипа 9 (AAV9), серотипа 9e (AAV9e), серотипа rh10 (AAVrh10), серотипа rh20 (AAVrh20), серотипа rh39 (AAVrh39), серотипа hu.37 (AAVhu.37), серотипа rh73 (AAVrh73), серотипа rh74 (AAVrh74), серотипа hu51 (AAV.hu51), серотипа hu21 (AAV.hu21), серотипа hu12 (AAV.hu12), или серотипа hu26 (AAV.hu26) AAV.
54. Клетка-хозяин, содержащая:
- искусственный геном, содержащий *цис*-кассету экспрессии, фланкированную ITR AAV, при этом *цис*-кассета экспрессии содержит трансген, кодирующий Fc-слитый белок к TNF α , причем Fc-слитый белок к TNF α содержит растворимую внеклеточную часть рецептора TNF α человека типа I (TNFR1) или типа II (TNFR2), ковалентно связанную пептидной связью с полипептидом, содержащим домен Fc тяжелой цепи иммуноглобулина, функционально связанный с одной или более регуляторными последовательностями, которые способствуют экспрессии трансгена в клетках ткани глаза человека;
 - транс*-кассету экспрессии, лишенную ITR AAV, где *транс*-кассета экспрессии кодирует гер AAV и капсидный белок AAV, функционально связанную с элементами контроля экспрессии, которые управляют экспрессией гер AAV и капсидного белка AAV в клетке-хозяине в культуре и обеспечивает гер AAV и капсидный белок AAV в *транс*-расположении; при этом капсид имеет тропизм к тканям глаза;
 - обеспечение хелперных функций аденовируса для обеспечения репликации и упаковки искусственного генома капсидным белком AAV.
55. Клетка-хозяин по пункту 54, отличающаяся тем, что трансген кодирует этанерцепт или EYS606.

56. Клетка-хозяин по пунктам 53 или 54, отличающаяся тем, что капсидный белок AAV имеет серотип 1 (AAV1), серотип 2 (AAV2), серотип 2.7m8 (AAV2.7m8), серотип 3 (AAV3), серотип 3B (AAV3B), серотип 4 (AAV4), серотип 5 (AAV5), серотип 6 (AAV6), серотип 7 (AAV7), серотип 8 (AAV8), серотип rh8 (AAVrh8), серотип 9 (AAV9), серотип 9e (AAV9e), серотип rh10 (AAVrh10), серотип rh20 (AAVrh20), серотип rh39 (AAVrh39), серотип hu.37 (AAVhu.37), серотип rh73 (AAVrh73), серотип rh74 (AAVrh74), серотип hu51 (AAV.hu51), серотип hu21 (AAV.hu21), серотип hu12 (AAV.hu12), или серотип hu26 (AAV.hu26) AAV.

4. КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0020] **Фиг. 1.** Схема конструкции генома вектора rAAV, содержащего кассету экспрессии, кодирующую этанерцепт, контролируемую элементами экспрессии, фланкированных ITR AAV.

[0021] **Фиг. 2А и 2В.** Аминокислотная последовательность Fc-слитых белков к TNF α этанерцепта (А) и EYS606 (В). Сайты гликозилирования выделены жирным шрифтом или подчеркнуты. Сайты гликозилирования глутамина; сайты (N) гликозилирования аспарагина, канонические и неконсенсусные сайты (N) гликозилирования аспарагина; и сайты O-сульфатирования тирозина (курсив) указаны в легенде. Домен Fc (домены CH2 и CH3) выделен серым цветом. Шарнирная область выделена курсивом. Сайт расщепления тромбина подчеркнут.

[0022] **Фиг. 3.** Множественное выравнивание последовательностей Clustal различных капсидов с тропизмом к ткани глаза. Аминокислотные замены (выделены жирным шрифтом в нижних рядах) могут быть произведены в капсидах AAV8 путем «набора» аминокислотных остатков из соответствующего положения других выровненных капсидов AAV. Последовательность показана серым цветом = гипервариабельные области. Аминокислотным последовательностям капсидов AAV присвоены идентификационные номера последовательностей, как показано на **Фиг. 3**.

[0023] **Фиг. 4.** Множественное выравнивание последовательностей Clustal константных областей тяжелой цепи (CH2 и CH3) IgG1 (SEQ ID NO: 47), IgG2 (SEQ ID NO: 48) и IgG4 (SEQ ID NO: 49). Шарнирная область от остатка 219 до остатка 230 тяжелой цепи показана курсивом. Нумерация аминокислот приведена в формате EU.

[0024] **Фиг. 5А и В. А.** Связывание TNF α между модельными видами (мышь, крыса и человек) векторизованными IgG адалимумаба и его Fab. Отрицательный контроль включал супернатант, полученный из нетрансфицированных клеток. Векторизованный ланаделумаб (pAAV.CAG.lanadelumab.IgG) использовали в качестве контрольного неспецифического антитела. Данные представлены в виде средних значений \pm СОС. **В.**

Связывание TNF α между модельными видами (мышь, крыса и человек) векторизованными IgG адалимумаба и этанерцепта. Отрицательный контроль включал супернатант, полученный из нетрансфицированных клеток. Векторизованный ланаделумаб (pAAV.CAG.lanadelumab.IgG) использовали в качестве контрольного неспецифического антитела. Данные представлены в виде средних значений \pm СОС.

5. ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0025] Описаны композиции и способы для системной доставки полностью человеческого посттрансляционно модифицированного (чПМ) терапевтического Fc-слитого белка к TNF α , который связывается с TNF α , субъекту-человеку с диагнозом неинфекционный увеит. Доставка может быть успешно осуществлена с помощью генной терапии, например, путем введения вирусного вектора или другой конструкции для экспрессии ДНК, кодирующей терапевтический Fc-слитый белок к TNF α (или гипергликозилированное производное любого из них), пациенту (субъекту-человеку), у которого диагностирован неинфекционный увеит, для создания постоянного депо в ткани или органе пациента, особенно в тканях глаза, таких как сетчатка, которое непрерывно поставляет чПМ Fc-слитый белок к TNF α , например, человеческий гликозилированный продукт трангена, в место, где Fc-слитый белок к TNF α оказывает терапевтический эффект.

[0026] В определенных вариантах осуществления чПМ Fc-слитый белок к TNF α , кодируемый трансгеном, но не ограничиваясь этим, представляет собой слитый белок TNFR:Fc, который связывает TNF α , в частности, этанерцепт или EYS606 (см. **Фиг. 2А** и **2В** для аминокислотной последовательности слитого белка TNFR-Fc этанерцепт и EYS606, соответственно). В вариантах осуществления при экспрессии Fc-слитый белок TNFR является димерным.

[0027] чПМ Fc-слитый белок к TNF α , кодируемый трансгеном, может включать, но не ограничиваться этим, терапевтический слитый белок TNFR1:Fc к TNF α , который связывается с TNF α , включая, но не ограничиваясь этим, EYS606. Аминокислотные последовательности вышеуказанных соединений представлены в таблице 6 ниже. Домен TNFR1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и домен Fc, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 (или 7 без шарнира), и белок EYS606, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12. чПМ слитый белок TNFR1:Fc к TNF α , кодируемый трансгеном, может включать, но не ограничиваться этим, димерный слитый белок, сконструированный таким образом, чтобы он содержал дополнительные сайты гликозилирования в домене Fc.

[0028] чПМ Fc-слитый белок к TNF α , кодируемый трансгеном, может включать, но не ограничиваться этим, терапевтический слитый белок TNFR2:Fc к TNF α , который связывается с TNF α , включая, но не ограничиваясь этим, этанерцепт. Аминокислотные последовательности вышеуказанных соединений представлены в таблице 6 ниже. Домен TNFR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и домен Fc, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 (SEQ ID NO 4 без шарнирной области), и этанерцепт, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10 (SEQ ID NO: 11, включая лидерную последовательность) с нуклеотидной последовательностью трансгена одной из SEQ ID NO: 13-18). чПМ слитый белок TNFR2:Fc к TNF α , кодируемый трансгеном, может включать, но не ограничиваться этим, димерный слитый белок, сконструированный таким образом, чтобы он содержал дополнительные сайты гликозилирования в домене Fc.

[0029] Композиции и способы, предложенные в данном документе, системно доставляют Fc-слитый белок к TNF α , в частности, этанерцепт и EYS606, из депо вирусных геномов, например, в глаз или печень/мышцу субъекта на уровне либо в ткани глаза (например, в стекловидном теле или водянистой влаге, или в сыворотке, который терапевтически или профилактически эффективен для лечения или облегчения симптомов неинфекционного увеита или другой патологии, которые можно лечить Fc-слитым белком к TNF α . В данном документе идентифицированы вирусные векторы для доставки трансгенов, кодирующих терапевтический Fc-слитый белок к TNF α , в клетки человека, включая, в вариантах осуществления, одну или более клеток ткани глаза, и регуляторные элементы, функционально связанные с нуклеотидной последовательностью, кодирующей Fc-слитый белок к TNF α , который способствует экспрессии антитела в клетках, в вариантах осуществления, в клетках ткани глаза. Такие регуляторные элементы, в том числе регуляторные элементы, специфичные для ткани глаза, представлены в таблице 1 и таблице 1a в данном документе. Соответственно, такие вирусные векторы могут быть доставлены субъекту-человеку в соответствующих дозах, таких, чтобы по меньшей мере через 20, 30, 40, 50 или 60 дней после введения Fc-слитый белок к TNF α присутствовал на терапевтически эффективных уровнях в сыворотке или в тканях глаза указанного субъекта-человека. В вариантах осуществления определяют терапевтически эффективный уровень Fc-слитого белка к TNF α (в испытаниях с участием людей, животных моделях, таких как те, что описаны в данном документе, и т. д.) для улучшения остроты зрения с максимальной коррекцией (BCVA) на ≥ 2 строки ETDRS или увеличения logMAR, снижения

воспалительной активности передней и задней камеры по классификации SUN и/или снижения степени помутнения стекловидного тела

[0030] Рекомбинантный вектор, используемый для доставки трансгена, включает нереплицирующиеся векторы на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса («гAAV»). гAAV являются особенно привлекательными векторами по ряду причин – они могут трансдуцировать нереплицирующиеся клетки и, следовательно, могут использоваться для доставки трансгена в ткани, где деление клеток происходит на низких уровнях, например, в сетчатке глаза; они могут быть модифицированы для преимущественного нацеливания на определенный выбранный орган; и существуют сотни серотипов капсида на выбор для получения желаемой тканевой специфичности и/или избегания нейтрализации уже существующими антителами пациента к некоторым AAV. Такие гAAV включают, но не ограничиваются ими, векторы на основе AAV, содержащие капсидные компоненты одного или более из AAV1, AAV2, AAV2.7m8 AAV3, AAV3B, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAV9, AAV9e, AAVrh10, AAVrh20, AAVrh39, AAVhu.37, AAVrh73, AAVrh74, AAV.hu51, AAV.hu21, AAV.hu12, или AAV.hu26. В определенных вариантах осуществления векторы на основе AAV, представленные в данном документе, содержат капсиды одного или более серотипов AAV2.7m8, AAV8, AAV9, AAV10 или AAVrh10.

[0031] Однако можно использовать другие вирусные векторы, включая, но не ограничиваясь ими, лентивирусные векторы; векторы на основе вируса осповакцины или невирусные экспрессирующие векторы, называемые конструкциями «голой ДНК». Экспрессия трансгена может контролироваться конститутивными или тканеспецифическими элементами контроля экспрессии.

[0032] Конструкции для генной терапии для терапевтического Fc-слитого белка к TNF α конструируют таким образом, что ковалентно связанные TNFR и часть Fc экспрессируются в виде димерного слитого белка. Например, слитый белок TNFR:Fc может включать всю шарнирную область или ее часть (например, SEQ ID NO: 5 или 9), которая связана с образованием дисульфидной связи между тяжелыми цепями. Предпочтительно TNFR1:Fc представляет собой биопрепарат с улучшенными характеристиками или биоаналог EYS606, или, более предпочтительно, TNFR:Fc представляет собой EYS606. Предпочтительно TNFR2:Fc представляет собой биопрепарат с улучшенными характеристиками или биоаналог этанерцепта, или, более предпочтительно, TNFR:Fc представляет собой этанерцепт.

[0033] В определенных вариантах осуществления нуклеиновые кислоты (например, полинуклеотиды) и последовательности нуклеиновых кислот, раскрытые в данном

документе, могут быть оптимизированы по кодонам, например, с помощью любого метода оптимизации кодонов, известного специалисту в данной области техники (см., например, обзор Quax et al., 2015, Mol Cell 59:149-161), а также может быть оптимизирован для уменьшения CpG-димеров. Нуклеотидные последовательности терапевтических Fc-слитых белков к TNF α , которые могут быть кодон-оптимизированы, описаны в таблице 7. Fc-слитый белок к TNF α требуется N-концевой лидер для обеспечения надлежащего посттрансляционного процессинга и секреции. В данном документе описаны лидерные последовательности, пригодные для экспрессии терапевтического Fc-слитого белка к TNF α в клетках человека. Иллюстративная рекомбинантная конструкция экспрессии показана на **Фиг. 1**.

[0034] Получение чПМ Fc-слитых белков к TNF α должно привести к получению молекулы с «улучшенными характеристиками» для лечения заболеваний с помощью генной терапии, например, путем введения вирусного вектора или другой конструкции для экспрессии ДНК, кодирующей Fc-слитый белок к TNF α , такой как этанерцепт или EYS606, пациенту (субъекту-человеку), у которого диагностировано заболевание, для которого показан этот Fc-слитый белок к TNF α , для создания постоянного депо у субъекта, который непрерывно поставляет человеческий гликозилированный, сульфатированный продукт трансгена, вырабатываемый трансдуцированными клетками субъекта. Конструкция кДНК для чПМ Fc-слитого белка к TNF α должна включать сигнальный пептид, который обеспечивает надлежащий ко- и посттрансляционный процессинг (гликозилирование и сульфатирование белка) трансдуцированными клетками человека.

[0035] Фармацевтические композиции, подходящие для введения людям, включают суспензию рекомбинантного вектора в буфере для состава, содержащем физиологически совместимый водный буфер, поверхностно-активное вещество и необязательные эксципиенты. Такой буфер для состава может содержать один или более из полисахаридов, поверхностно-активных веществ, полимеров или масел.

[0036] В качестве альтернативы или дополнительного лечения к генной терапии полноразмерного чПМ Fc-слитого белка к TNF α можно продуцировать в линиях клеток человека с помощью технологии рекомбинантной ДНК, а гликопротеин можно вводить пациентам. Линии клеток человека, которые можно использовать для такой продукции рекомбинантных гликопротеинов, включают, но не ограничиваются ими, клетки эмбриональной почки человека 293 (HEK293), фибросаркомы HT-1080, НКВ-11, CAP, HuH-7 и линии клеток сетчатки, PER.C6, или RPE и это лишь некоторые из тех (например, см. Dumont et al., 2015, Crit. Rev. Biotechnol. 36(6):1110-1122, который полностью включен в

качестве ссылки для обзора линий клеток человека, которые могут быть использованы для рекомбинантной продукции чПМ биологического препарата). Для гарантирования полного гликозилирования, особенно сиалирования и сульфатирования тирозина, линия клеток, используемая для продукции, может быть усилена путем инженерии клеток-хозяев для совместной экспрессии α -2,6-сиалилтрансферазы (или обеих α -2,3- и α -2,6-сиалилтрансферазы) и/или ферментов TPST-1 и TPST-2, ответственных за O-сульфатирование тирозина в клетках человека.

[0037] Необязательно, чтобы каждая молекула, полученная с помощью генной терапии или протеинотерапии, была полностью гликозилирована и сульфатирована. Точнее, совокупность продуцируемых гликопротеинов должна иметь достаточное гликозилирование (включая 2,6-сиалирование) и сульфатирование, чтобы продемонстрировать эффективность. Целью генной терапии согласно изобретению является замедление или остановка прогрессирования заболевания.

[0038] Комбинированная терапия, включающая доставку чПМ Fc-слитого белка к TNF α пациенту в сочетании с введением других доступных средств для лечения, охватывается способами по изобретению. Дополнительные средства для лечения можно вводить до, одновременно или после генной терапии. Такие дополнительные средства для лечения могут включать, но не ограничиваются ими, совместную терапию терапевтическими Fc-слитым белком к TNF α .

[0039] Также представлены способы производства вирусных векторов, в частности вирусных векторов на основе AAV. В конкретных вариантах осуществления представлены способы получения рекомбинантных AAV, включающие культивирование клетки-хозяина, содержащей искусственный геном, содержащий цис-кассету экспрессии, фланкированную ITR AAV, при этом цис-кассета экспрессии содержит трансген, кодирующий терапевтический Fc-слитый белок к TNF α , функционально связанный с элементами контроля экспрессии, которые будут контролировать экспрессию трансгена в клетках человека; транс-кассету экспрессии без ITR AAV, при этом транс-кассета экспрессии кодирует гер и капсидный белок AAV, функционально связанный с элементами контроля экспрессии, которые управляют экспрессией гер и капсидных белков AAV в клетке-хозяине в культуре и обеспечивают белки гер и сар в транс-расположении; обеспечение хелперных функций аденовируса для обеспечения репликации и упаковки искусственного генома капсидными белками AAV; и выделение рекомбинантного AAV, инкапсулирующего искусственный геном, из культуры клеток.

5.1 ОПРЕДЕЛЕНИЯ

[0040] Фраза «слитый белок Fc к TNF α » означает полипептид, содержащий растворимый внеклеточный домен или часть рецептора TNF α , включая рецептор TNF- α p55 или p75, ковалентно связанный, например, посредством пептидной связи, с доменом Fc иммуноглобулина, особенно IgG.

[0041] Термины «регуляторный элемент» или «регуляторный элемент нуклеиновой кислоты» представляют собой некодирующие последовательности нуклеиновых кислот, которые регулируют транскрипцию соседних генов. Цис-регуляторные элементы обычно регулируют транскрипцию генов путем связывания с факторами транскрипции. Это включает «составные регуляторные элементы нуклеиновой кислоты», содержащие более одного энхансерного или промоторного элемента, как описано в данном документе.

[0042] Термин «кассета экспрессии» или «кассета экспрессии нуклеиновой кислоты» относится к молекулам нуклеиновой кислоты, которые включают один или более элементов регуляции транскрипции, включая, помимо прочего, промоторы, энхансеры и/или регуляторные элементы, интроны и последовательности полиаденилирования. Энхансеры и промоторы, как правило, функционируют, регулируя экспрессию (транс)гена в одном или более желаемых типах клеток, тканях или органах.

[0043] Термин «функционально связанный» и «функционально связанный с» относится к последовательностям нуклеиновых кислот, которые являются связанными и, как правило, смежными или по существу смежными, а если необходимо соединить две области, кодирующие белок, смежными и в рамке считывания. Однако, поскольку энхансеры, как правило, функционируют, когда они отделены от промотора несколькими тысячами пар оснований, а интронные последовательности могут иметь переменную длину, некоторые полинуклеотидные элементы могут быть функционально связаны и все еще быть функциональными, хотя и не примыкают непосредственно к расположенному ниже промотору и трансгену.

[0044] Термин «AAV» или «аденоассоциированный вирус» относится к депендопарвовирусу из рода вирусов Parvoviridae. AAV может представлять собой AAV, полученный из встречающегося в природе вируса «дикого типа», AAV, полученный из генома гAAV, упакованного в капсид, содержащий капсидные белки, кодируемые природным геном сар, и/или из генома гAAV, упакованного в капсид, содержащий капсидные белки, кодируемые неприродным геном капсида сар. Пример последнего включает гAAV, имеющий капсидный белок, имеющий пептидную вставку или модификацию аминокислотной последовательности природного капсида.

[0045] Термин «гAAV» относится к «рекомбинантному AAV». В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный AAV имеет геном AAV, в котором часть или все гены гер и сар заменены гетерологичными последовательностями.

[0046] Термин «хелперная плаزمида гер-сар» относится к плазмиде, которая обеспечивает функцию вирусных генов гер и сар и способствует продукции AAV из геномов гAAV, в которых отсутствуют функциональные последовательности генов гер и/или сар.

[0047] Термин «ген сар» относится к последовательностям нуклеиновых кислот, которые кодируют капсидные белки, которые формируют или помогают формировать капсидную оболочку вируса. Для AAV капсидный белок может представлять собой VP1, VP2 или VP3.

[0048] Термин «ген гер» относится к последовательностям нуклеиновых кислот, которые кодируют неструктурный белок, необходимый для репликации и продукции вируса.

[0049] Термины «нуклеиновые кислоты» и «нуклеотидные последовательности» включают молекулы ДНК (например, кДНК или геномную ДНК), молекулы РНК (например, мРНК), комбинации молекул ДНК и РНК или гибридные молекулы ДНК/РНК и аналоги ДНК или РНК. молекулы. Такие аналоги могут быть созданы с использованием, например, аналогов нуклеотидов, которые включают, но не ограничиваются ими, инозин или тритилированные основания. Такие аналоги могут также включать молекулы ДНК или РНК, содержащие модифицированные скелеты, которые придают молекулам полезные свойства, такие как, например, устойчивость к нуклеазам или повышенная способность проникать через клеточные мембраны. Нуклеиновые кислоты или нуклеотидные последовательности могут быть одноцепочечными, двухцепочечными, могут содержать как одноцепочечные, так и двухцепочечные части и могут содержать трехцепочечные части, но предпочтительно представляют собой двухцепочечную ДНК.

[0050] Термины «субъект», «хозяин» и «пациент» используются взаимозаменяемо. В контексте данного документа субъект предпочтительно представляет собой млекопитающее, такое как отличный от человека примат (например, коровы, свиньи, лошади, кошки, собаки, крысы и т. д.) или примат (например, обезьяна и человек), наиболее предпочтительно человек.

[0051] Термин «терапевтический агент» или «биотерапевтический агент» относится к любому агенту, который можно использовать для лечения, контроля или облегчения симптомов, связанных с заболеванием или нарушением, где заболевание или нарушение связано с функцией, которую должен обеспечивать трансген. В контексте данного документа «терапевтически эффективное количество» относится к количеству агента

(например, количеству продукта, экспрессируемого трансгеном), которое обеспечивает по меньшей мере одно терапевтическое преимущество при лечении или сдерживании целевого заболевания или нарушения при введении субъекту, имеющему это заболевание или нарушение. Кроме того, терапевтически эффективное количество в отношении агента по изобретению означает такое количество агента отдельно или в комбинации с другими видами терапии, которое обеспечивает по меньшей мере одно терапевтическое преимущество при лечении или сдерживании заболевания или нарушения.

[0052] Фраза «специфический для печени» или «направленный на печень» относится к элементам нуклеиновой кислоты, которые изменили свою активность в клетках или ткани печени (печеночной) благодаря взаимодействию таких элементов с внутриклеточной средой клеток печени. Печень функционирует как биореактор или «депо» для организма в контексте генной терапии, доставляемой в ткань печени, и генная кассета, улучшенная в отношении экспрессии в печени, будет продуцировать биотерапевтический препарат (транслируемый белок), который секретируется в кровоток. Таким образом, биотерапевтический агент системно доставляется субъекту путем экспрессии в печени. Не ограничиваясь какой-либо одной теорией, продукция печенью биотерапевтического агента (например, продуцируемого доставленным трансгеном) может обеспечить иммунотолерантность к агенту, так что эндогенные Т-клетки субъекта, продуцирующие белок, будут распознавать белок как собственный белок, и не будут индуцировать врожденный иммунный ответ.

5.2 КОНСТРУКЦИИ

[0053] В данном документе представлены вирусные векторы или другие конструкции экспрессии ДНК, кодирующие чПМ Fc-слитый белок к TNF α . Вирусные векторы и другие конструкции для экспрессии ДНК, представленные в данном документе, включают любой подходящий способ доставки трансгена в клетку-мишень. Способы доставки трансгена включают вирусные векторы, липосомы, другие липидсодержащие комплексы, другие макромолекулярные комплексы, синтетическую модифицированную мРНК, немодифицированную мРНК, малые молекулы, биологически неактивные молекулы (например, частицы золота), полимеризованные молекулы (например, дендримеры), голую ДНК, плазмиды, фаги, транспозоны, космиды или эписомы. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой нацеленный вектор, например, вектор, нацеленный на клетки ткани глаза, или вектор, обладающий тропизмом к клеткам ткани глаза.

[0054] В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к нуклеиновой кислоте для применения, при этом нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную

последовательность, кодирующую чПМ Fc-слитый белок к TNF α , в качестве трансгена, описанного в данном документе, функционально связанную с промотором, выбранным для экспрессии в ткани, предназначенной для экспрессии трансгена, например, но не ограничиваясь ими, универсальные промоторы, такие как промотор CB7/CAG (SEQ ID NO: 50) и связанные расположенные выше регуляторные последовательности, промотор цитомегаловируса (CMV), промотор EF-1 альфа (SEQ ID NO:53), mU1a (SEQ ID NO:52), промотор UB6, промотор куриного бета-актина (CBA) и промоторы, специфичные для тканей глаза, такие как промотор родопсинкиназы человека (GRK1) (SEQ ID NO:54 или 117), промотор аррестина колбочек мыши (CAR) (SEQ ID NO: 114-116), промотор красного опсина человека (RedO) (SEQ ID NO: 112), промотор CB (SEQ ID NO: 159), промотор CBLong (SEQ ID NO: 160) или промотор Best1/GRK (SEQ ID NO: 161). См. таблицы 1 и 1a для перечня полезных промоторов.

[0055] В определенных вариантах осуществления в данном документе представлены рекомбинантные векторы, которые содержат одну или более нуклеиновых кислот (например, полинуклеотиды). Нуклеиновые кислоты могут содержать ДНК, РНК или комбинацию ДНК и РНК. В определенных вариантах осуществления ДНК содержит одну или более последовательностей, выбранных из группы, состоящей из промоторных последовательностей, последовательности представляющего интерес гена (трансгена, например, нуклеотидных последовательностей, кодирующих чПМ Fc-слитый белок к TNF α), нетранслируемых областей и последовательности терминации. В определенных вариантах осуществления вирусные векторы, представленные в данном документе, содержат промотор, функционально связанный с представляющим интерес геном.

[0056] В определенных вариантах осуществления нуклеиновые кислоты (например, полинуклеотиды) и последовательности нуклеиновых кислот, описанные в данном документе, могут быть кодон-оптимизированы, например, с помощью любого метода оптимизации кодонов, известного специалисту в данной области техники (см., например, обзор Quax et al., 2015, Mol Cell 59:149-161). Нуклеотидные последовательности для экспрессии слитого белка к TNF α в клетках человека представлены в данном документе в таблице 7.

[0057] В конкретном варианте осуществления конструкции, описанные в данном документе, содержат следующие компоненты: (1) инвертированные концевые повторы AAV2, которые фланкируют кассету экспрессии; (2) один или более регуляторных элементов, b) необязательно, интрон куриного β -актина или другой интрон и с) поли(A)-сигнал β -глобина кролика; и (3) последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие растворимый внеклеточный домен TNFR2, связанный с N-концом домена Fc IgG1 человека,

где домен Fc включает от N-конца к C-концу: шарнирная область – домен CH2 – домен CH3 (этанерцепт). Иллюстративная конструкция показана на **Фиг. 1** и на **Фиг. 2А**.

[0058] В конкретном варианте осуществления конструкции, описанные в данном документе, содержат следующие компоненты: (1) инвертированные концевые повторы AAV2, которые фланкируют касету экспрессии; (2) один или более регуляторных элементов, b) необязательно, интрон куриного β -актина или другой интрон и c) поли(A)-сигнал β -глобина кролика; и (3) последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие растворимый внеклеточный домен TNFR1, связанный через сайт расщепления тромбина с N-концом домена Fc IgG1 человека, где домен Fc включает от N-конца к C-концу: шарнирная область – домен CH2 – домен CH3 (EYS060). Иллюстративная конструкция показана на **Фиг. 2В**.

5.2.1 Векторы на основе мРНК

[0059] В определенных вариантах осуществления, в качестве альтернативы векторам на основе ДНК, векторы, представленные в данном документе, представляют собой модифицированную мРНК, кодирующую представляющий интерес ген (например, трансген, например, биологический препарат на основе чПМ немоноклонального антитела). Синтез модифицированной и немодифицированной мРНК для доставки трансгена к клеткам пигментного эпителия сетчатки описан, например, в Hansson et al., J. Biol. Chem., 2015, 290(9):5661-5672, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки. В определенных вариантах осуществления в данном документе представлена модифицированная мРНК, кодирующая чПМ Fc-слитый белок к TNF α .

5.2.2 Вирусные векторы

[0060] Вирусные векторы включают векторы на основе аденовируса, аденоассоциированного вируса (AAV, например, AAV2.7m8, AAV3, AAV8, AAV9, AAVrh10, AAV2.7m8, и других серотипов), лентивируса, хелпер-зависимого аденовируса, вируса простого герпеса, поксвируса, гемагглютинирующего японского вируса (HVJ), альфавируса, вируса коровьей оспы, и ретровируса. Векторы на основе ретровируса включают векторы на основе вируса лейкоза мышей (MLV) и вируса иммунодефицита человека (ВИЧ). Векторы на основе альфавируса включают вирус леса Семлики (SFV) и вирус Синдбис (SIN). В определенных вариантах осуществления вирусные векторы, представленные в данном документе, представляют собой рекомбинантные вирусные векторы. В определенных вариантах осуществления вирусные векторы, представленные в данном документе, изменены так, что они являются дефицитными по репликации у людей. В определенных вариантах осуществления вирусные векторы представляют собой гибридные векторы, например, вектор AAV, помещенный в аденовирусный вектор «без

хелпера». В определенных вариантах осуществления в данном документе представлены вирусные векторы, содержащие вирусный капсид из первого вируса и белки вирусной оболочки из второго вируса. В конкретных вариантах осуществления второй вирус представляет собой вирус везикулярного стоматита (VSV). В более конкретных вариантах осуществления белок оболочки представляет собой белок VSV-G.

[0061] В определенных вариантах осуществления вирусные векторы, представленные в данном документе, представляют собой вирусные векторы на основе ВИЧ. В определенных вариантах осуществления векторы на основе ВИЧ, представленные в данном документе, содержат по меньшей мере два полинуклеотида, при этом гены gag и pol получены из генома ВИЧ, а ген env получены из другого вируса.

[0062] В определенных вариантах осуществления вирусные векторы, представленные в данном документе, представляют собой вирусные векторы на основе вируса простого герпеса. В определенных вариантах осуществления векторы на основе вируса простого герпеса, представленные в данном документе, модифицированы таким образом, что они не содержат один или более немедленно ранних (IE) генов, что делает их нецитотоксичными.

[0063] В определенных вариантах осуществления вирусные векторы, представленные в данном документе, представляют собой вирусные векторы на основе MLV. В определенных вариантах осуществления векторы на основе MLV, представленные в данном документе, содержат до 8 т.п.н. гетерологичной ДНК вместо вирусных генов.

[0064] В определенных вариантах осуществления вирусные векторы, представленные в данном документе, представляют собой вирусные векторы на основе лентивирусов. В определенных вариантах осуществления лентивирусные векторы, представленные в данном документе, получены из лентивирусов человека. В определенных вариантах осуществления лентивирусные векторы, представленные в данном документе, получены из нечеловеческих лентивирусов. В определенных вариантах осуществления лентивирусные векторы, представленные в данном документе, упакованы в лентивирусный капсид. В определенных вариантах осуществления лентивирусные векторы, представленные в данном документе, содержат один или более из следующих элементов: длинные концевые повторы, сайт связывания праймера, полипуриновый тракт, сайты att и сайт инкапсулирования.

[0065] В определенных вариантах осуществления вирусные векторы, представленные в данном документе, представляют собой вирусные векторы на основе альфавирусов. В определенных вариантах осуществления альфавирусные векторы, представленные в данном документе, представляют собой рекомбинантные дефектные по

репликации альфа-вирусы. В определенных вариантах осуществления альфа-вирусные репликоны в альфа-вирусных векторах, представленных в данном документе, нацелены на конкретные типы клеток путем экспонирования функционального гетерологичного лиганда на их поверхности вириона.

[0066] В определенных вариантах осуществления вирусные векторы, представленные в данном документе, представляют собой вирусные векторы на основе AAV. В определенных вариантах осуществления векторы на основе AAV, представленные в данном документе, не кодируют ген гер AAV (необходимый для репликации) и/или ген сар AAV (необходимый для синтеза капсидных белков) (белки гер и сар могут быть обеспечены упаковывающими клетками в транс-расположении). Идентифицировано множество серотипов AAV. В определенных вариантах осуществления векторы на основе AAV, представленные в данном документе, содержат компоненты из одного или более серотипов AAV. В предпочтительных вариантах осуществления векторы на основе AAV, предложенные в данном документе, содержат компоненты одного или нескольких серотипов AAV с тропизмом к тканям глаза, печени и/или мышцам. В тексте описания «серотип» AAV относится к AAV, имеющему иммунологически отличный капсид, природный капсид или сконструированный капсид. В некоторых вариантах осуществления векторы на основе AAV, предложенные в данном документе, содержат капсидные компоненты одного или более из AAV1, AAV2, AAV2.7m8, AAV3, AAV3B, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAV9, AAV9e, AAVrh10, AAVrh20, AAVrh39, AAVhu.37, AAVrh73, AAVrh74, AAV.hu51, AAV.hu21, AAV.hu12, или AAV.hu26. В определенных вариантах осуществления векторы на основе AAV, представленные в данном документе, представляют собой или содержат компоненты из одного или более серотипов AAV2.7m8, AAV8, AAV3B, AAV9, AAV10, AAVrh73, или AAVrh10. Предложены вирусные векторы, в которых капсидный белок является вариантом капсидного белка AAV8 (SEQ ID NO: 32), капсидного белка AAV3B (SEQ ID NO: 26) или капсидного белка AAVrh73 (SEQ ID NO: 38), и капсидный белок, например, по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 99,9% идентичен аминокислотной последовательности капсидного белка AAV8 (SEQ ID NO: 32), капсидного белка AAV3B (SEQ ID NO: 26) или капсидного белка AAVrh73 (SEQ ID NO: 38), сохраняя при этом биологическую функцию нативного капсида. В определенных вариантах осуществления кодируемый капсид AAV имеет последовательность SEQ ID NO: 32 с 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 аминокислотными заменами и сохранением биологической функции капсида AAV8, AAV3B или AAVrh73. На **Фиг. 3** представлено сравнительное выравнивание аминокислотных последовательностей капсидных белков различных серотипов AAV с потенциальными

аминокислотами, которые могут быть заменены в определенных положениях в выровненных последовательностях на основе сравнения в строке, обозначенной SUBS. Соответственно, в конкретных вариантах осуществления вектор AAV содержит вариант капсида AAV8, AAV3B, или AAVrh73, который имеет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 аминокислотных замен, которые не присутствуют в этом положении в последовательности нативного капсида AAV, как указано в ряде SUBS на **Фиг. 3**. Аминокислотная последовательность для капсидов AAV8, AAV3B или AAVrh73 представлена на **Фиг. 3**.

[0067] В некоторых вариантах осуществления векторы на основе AAV содержат компоненты из одного или более серотипов AAV. В некоторых вариантах осуществления векторы на основе AAV, представленные в данном документе, содержат компоненты капсида из одного или более из AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV13, AAV14, AAV15, AAV16, AAV.rh8, AAV.rh10, AAV.rh20, AAV.rh39, AAV.Rh74, AAV.RHM4-1, AAV.hu37, AAV.Anc80, AAV.Anc80L65, AAV.7m8, AAV.PHP.B, AAV.PHP.eB, AAV2.5, AAV2tYF, AAV3B, AAV.LK03, AAV.HSC1, AAV.HSC2, AAV.HSC3, AAV.HSC4, AAV.HSC5, AAV.HSC6, AAV.HSC7, AAV.HSC8, AAV.HSC9, AAV.HSC10, AAV.HSC11, AAV.HSC12, AAV.HSC13, AAV.HSC14, AAV.HSC15, или AAV.HSC16, или других частиц rAAV, или комбинаций двух или более из них. В некоторых вариантах осуществления векторы на основе AAV, представленные в данном документе, содержат компоненты из одного или более из AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV13, AAV14, AAV15, AAV16, AAV.rh8, AAV.rh10, AAV.rh20, AAV.rh39, AAV.Rh74, AAV.RHM4-1, AAV.hu37, AAV.Anc80, AAV.Anc80L65, AAV.7m8, AAV.PHP.B, AAV.PHP.eB, AAV2.5, AAV2tYF, AAV3B, AAV.LK03, AAV.HSC1, AAV.HSC2, AAV.HSC3, AAV.HSC4, AAV.HSC5, AAV.HSC6, AAV.HSC7, AAV.HSC8, AAV.HSC9, AAV.HSC10, AAV.HSC11, AAV.HSC12, AAV.HSC13, AAV.HSC14, AAV.HSC15, или AAV.HSC16, или других частицах rAAV, или комбинаций двух или более серотипов. В некоторых вариантах осуществления частицы rAAV содержат белок капсида, который на по меньшей мере 80% или более, например 85%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% и т.д., т.е. до 100% идентичен, например, последовательности VP1, VP2 и/или VP3 серотипа капсида AAV, выбранного из AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV13, AAV14, AAV15, AAV16, AAV.rh8, AAV.rh10, AAV.rh20, AAV.rh39, AAV.Rh74, AAV.RHM4-1, AAV.hu37, AAV.Anc80, rAAV.Anc80L65, AAV.7m8, AAV.PHP.B, AAV.PHP.eB, AAV2.5, AAV2tYF, AAV3B, AAV.LK03, AAV.HSC1, AAV.HSC2, AAV.HSC3, AAV.HSC4, AAV.HSC5, AAV.HSC6, AAV.HSC7, AAV.HSC8, AAV.HSC9, AAV.HSC10, AAV.HSC11,

AAV.HSC12, AAV.HSC13, AAV.HSC14, AAV.HSC15, или AAV.HSC16, или его производного, модификации или псевдотипа.

[0068] В конкретных вариантах осуществления рекомбинантный AAV для применения в композициях и способах, описанных в данном документе, представляет собой Anc80 или Anc80L65 (см., например, Zinn et al., 2015, Cell Rep. 12 (6): 1056-1068, который полностью включен посредством ссылки). В конкретных вариантах осуществления рекомбинантный AAV для применения в композициях и способах, описанных в данном документе, представляет собой AAV.7m8 (включая его варианты) (см., например, US 9193956; US 9458517; US 9587282; US 2016/0376323 и WO 2018/075798, каждый из которых полностью включен в данный документ посредством ссылки). В конкретных вариантах осуществления AAV для применения в композициях и способах, описанных в данном документе, представляет собой любой AAV, описанный в US 9585971, такой как AAV-RNP. В конкретных вариантах осуществления AAV для применения в композициях и способах по данному изобретению представляет собой вектор AAV2/Rec2 или AAV2/Rec3, который имеет гибридные капсидные последовательности, полученные из AAV8 и серотипов *cu5*, *rh20* или *rh39* (см., например, Issa et al., 2013, PLoS One 8 (4): e60361, который включен в данный документ посредством ссылки для этих векторов). В конкретных вариантах осуществления AAV для применения в композициях и способах, описанных в данном документе, представляет собой AAV, раскрытый в любом из нижеследующего, каждый из которых полностью включен в данный документ посредством ссылки: US 7282199; US 7906111; US 8524446; US 8999678; US 8628966; US 8927514; US 8734809; US 9284357; US 9409953; US 9169299; US 9193956; US 9458517; US 9587282; US 2015/0374803; US 2015/0126588; US 2017/0067908; US 2013/0224836; US 2016/0215024; US 2017/0051257; PCT/US2015/034799; и PCT/EP2015/053335. В некоторых вариантах осуществления частицы гAAV содержат белок капсида, который на по меньшей мере 80% или более, например, 85%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% и т.д., т.е. до 100% идентичен последовательности VP1, VP2 и/или VP3 капсида AAV, раскрытого в любом/любой из следующих патентов и заявок на патенты, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки: патенты США №№ 7282199; 7906111; 8524446; 8999678; 8628966; 8927514; 8734809; US 9284357; 9409953; 9169299; 9193956; 9458517; и 9587282; публикации заявок на патенты США №№ 2015/0374803; 2015/0126588; 2017/0067908; 2013/0224836; 2016/0215024; 2017/0051257; и международные заявки на патент №№ PCT/US2015/034799; PCT/EP2015/053335.

[0069] В некоторых вариантах осуществления частицы гAAV содержат любой капсид AAV, раскрытый в патенте США № 9840719 и WO 2015/013313, такой как AAV.Rh74

и RHM4-1, каждый из которых полностью включен в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления частицы гAAV содержат любой капсид AAV, описанный в WO 2014/172669, такой как AAV rh.74, который полностью включен в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления частицы гAAV содержат капсид AAV2/5, как описано в Georgiadis et al., 2016, Gene Therapy 23: 857-862 и Georgiadis et al., 2018, Gene Therapy 25: 450, каждый из которых включен по ссылке в полном объеме. В некоторых вариантах осуществления частицы гAAV содержат любой капсид AAV, описанный в WO 2017/070491, такой как AAV2tYF, который полностью включен в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления частицы гAAV содержат капсиды AAVLK03 или AAV3B, как описано в Puzzo et al., 2017, Sci. Transl. Med. 29(9): 418, которая включена в данный документ посредством ссылки в полном объеме. В некоторых вариантах осуществления частицы гAAV содержат любой капсид AAV, раскрытый в патентах США №№ 8628966; US 8927514; US 9923120 и WO 2016/049230, такие как HSC1, HSC2, HSC3, HSC4, HSC5, HSC6, HSC7, HSC8, HSC9, HSC10, HSC11, HSC12, HSC13, HSC14, HSC15 или HSC16, каждый из которых включен посредством ссылки в полном объеме.

[0070] В некоторых вариантах осуществления частицы гAAV содержат белок капсида, описанный в Межд. публ. заявки № WO 2003/052051 (см., например, SEQ ID NO: 2 публикации '051), WO 2005/033321 (см., например, SEQ ID NO: 123 и 88 публикации '321), WO 03/042397 (см., например, SEQ ID NO: 2, 81, 85 и 97 публикации '397), WO 2006/068888 (см., например, SEQ ID NO: 1 и 3-6 публикации '888), WO 2006/110689, (см., например, SEQ ID NO: 5-38 публикации '689) WO2009/104964 (см., например, SEQ ID NO: 1-5, 7, 9, 20, 22, 24 и 31 публикации '964), WO 2010/127097 (см., например, SEQ ID NO: 5-38 публикации '097) и WO 2015/191508 (см., например, SEQ ID NO: 80-294 публикации '508) и публ. заявки США № 20150023924 (см., например, SEQ ID NO: 1, 5-10 публикации '924), содержание каждого из которых полностью включено в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления частицы гAAV имеют белок капсида, который на по меньшей мере 80% или более, например, 85%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% и т.д., т.е. до 100% идентичен последовательности VP1, VP2 и/или VP3 капсида AAV, раскрытого в межд. публ. заявки № WO 2003/052051 (см., например, SEQ ID NO: 2 из публикации '051), WO 2005/033321 (см. например, SEQ ID NO: 123 и 88 из публикации '321), WO 03/042397 (см., например, SEQ ID NO: 2, 81, 85, и 97 из публикации '397), WO 2006/068888 (см., например, SEQ ID NO: 1 и 3-6 из публикации '888), WO 2006/110689 (см., например, SEQ ID NO: 5-38 из публикации '689) WO2009/104964 (см., например, SEQ ID NO: 1-5, 7, 9, 20, 22, 24 и 31 из публикации

964), WO 2010/127097 (см., например, SEQ ID NO: 5-38 из публикации '097), и WO 2015/191508 (см., например, SEQ ID NO: 80-294 из публикации '508), и публ. заявки США № 20150023924 (см., например, SEQ ID NO: 1, 5-10 публикации '924).

[0071] В дополнительных вариантах осуществления частицы гAAV содержат капсид псевдотипированного AAV. В некоторых вариантах осуществления капсиды псевдотипированного AAV представляют собой капсиды псевдотипированного AAV гAAV2/8 или гAAV2/9. Способы получения и применения псевдотипированных частиц гAAV известны в данной области техники (см., например, Duan et al., *J. Virol.*, 75:7662-7671 (2001); Halbert et al., *J. Virol.*, 74:1524-1532 (2000); Zolotukhin et al., *Methods* 28:158-167 (2002); и Auricchio et al., *Hum. Molec. Genet.* 10:3075-3081, (2001).

[0072] В некоторых описанных в данном документе способах используются вирусные векторы на основе AAV2.7m8, AAV8, AAV9, и AAVrh10. Нуклеотидные последовательности вирусных векторов на основе AAV и способы получения рекомбинантных капсидов AAV и AAV описаны, например, в патенте США № 9193956 B2, в патенте США № 7282199 B2, патенте США № 7790449 B2, патенте США № 8318480 B2, патенте США № 8962332 B2 и международной заявке на патент № PCT/EP2014/076466, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки. В одном аспекте в настоящем документе представлены вирусные векторы на основе AAV (например, AAV2.7m8, AAV8, AAV9 или AAVrh10), кодирующие трансген (например, чПМ димерный слитый белок). Аминокислотные последовательности капсидов AAV, включая AAV2.7m8, AAV8, AAV9 и AAVrh10, представлены на Фиг. 3.

[0073] В определенных вариантах осуществления можно использовать описанный выше одноцепочечный AAV (ssAAV). В определенных вариантах осуществления может использоваться самокомплементарный вектор, например, scAAV (см., например, Wu, 2007, *Human Gene Therapy*, 18(2):171-82, McCarty et al, 2001, *Gene Therapy*, Vol 8, Number 16, страницы 1248-1254; и патенты США №№ 6596535; 7125717; и 7456683, каждый из которых полностью включен в данный документ посредством ссылки).

[0074] В определенных вариантах осуществления вирусные векторы, используемые в описанных в данном документе способах, представляют собой вирусные векторы на основе аденовируса. Вектор на основе рекомбинантного аденовируса можно использовать для переноса трансгена, кодирующего чПМ Fc-слитый белок к TNF α . Рекомбинантный аденовирус может представлять собой вектор первого поколения с делецией E1, с делецией E3 или без нее, а также с кассетой экспрессии, вставленной в любую удаленную область. Рекомбинантный аденовирус может быть вектором второго поколения, который содержит полные или частичные делеции областей E2 и E4. Хелпер-зависимый аденовирус сохраняет

только инвертированные концевые повторы аденовируса и сигнал упаковки (ϕ). Трансген вставляется между сигналом упаковки и 3' ITR, со спейсерными последовательностями или без них, чтобы сохранить геном, близкий по размеру с диким типом, приблизительно 36 т.п.н. Иллюстративный протокол для получения аденовирусных векторов можно найти в Alba et al., 2005, "Gutless adenovirus: last generation adenovirus for gene therapy," *Gene Therapy* 12:S18-S27, который полностью включен в данный документ посредством ссылки.

[0075] В определенных вариантах осуществления вирусные векторы, используемые в описанных в данном документе способах, представляют собой вирусные векторы на основе лентивируса. Рекомбинантный лентивирусный вектор можно использовать для переноса трансгена, кодирующего чПМ Fc-слитый белок к TNF α . Для изготовления конструкции используют четыре плазмиды: плазмиду, содержащую последовательность Gag/pol, плазмиду, содержащую последовательность Rev, плазмиду, содержащую белок оболочки (например, VSV-G), и цис-плазмиду с элементами упаковки и Fc-слитым белком к TNF α .

[0076] Для получения лентивирусного вектора четыре плазмиды котрансфицируют в клетки (например, клетки на основе HEK293), в результате чего полиэтиленмин или фосфат кальция можно использовать, среди прочего, в качестве агентов трансфекции. Затем лентивирус собирают в супернатанте (для активности лентивирусы должны отпочковываться от клеток, поэтому сбор клеток не требуется). Супернатант фильтруют (0,45 мкм), а затем добавляют хлорид магния и бензоазу. Дальнейшие процессы выделения и очистки могут широко варьироваться, при этом использование TFF и колоночной хроматографии являются наиболее совместимыми с GMP. Другие используют ультрацентрифугирование с/без колоночной хроматографии. Иллюстративные протоколы для получения лентивирусных векторов можно найти в Lesch et al., 2011, "Production and purification of lentiviral vector generated in 293T suspension cells with baculoviral vectors," *Gene Therapy* 18:531-538, и Ausubel et al., 2012, "Production of CGMP-Grade Lentiviral Vectors," *Bioprocess Int.* 10(2):32-43, оба из которых полностью включены в данный документ посредством ссылки.

[0077] В конкретном варианте осуществления вектор для применения в способах, описанных в данном документе, представляет собой вектор, который кодирует чПМ Fc-слитый белок к TNF α , так что при введении вектора в соответствующую клетку гликозилированный и/или тирозинсульфатированный вариант чПМ Fc-слитого белка к TNF α экспрессируется клеткой.

5.2.3 Промоторы и модификаторы экспрессии генов

[0078] В определенных вариантах осуществления векторы, представленные в данном документе, содержат компоненты, которые модулируют доставку гена или экспрессию гена (например, «элементы регуляции экспрессии»). В определенных вариантах осуществления векторы, представленные в данном документе, содержат компоненты, которые модулируют экспрессию генов. В определенных вариантах осуществления векторы, представленные в данном документе, содержат компоненты, которые влияют на связывание или нацеливание на клетки. В определенных вариантах осуществления векторы, представленные в данном документе, содержат компоненты, которые влияют на локализацию полинуклеотида (например, трансгена) в клетке после поглощения. В определенных вариантах осуществления векторы, представленные в данном документе, содержат компоненты, которые можно использовать в качестве детектируемых или селективируемых маркеров, например, для обнаружения или отбора клеток, которые поглотили полинуклеотид.

[0079] В определенных вариантах осуществления вирусные векторы, представленные в данном документе, содержат один или более промоторов, которые контролируют экспрессию трансгена. Эти промоторы (и другие регуляторные элементы, контролирующие транскрипцию, такие как энхансеры) могут быть конститутивными (способствовать повсеместной экспрессии) или могут специфически или селективно экспрессироваться в тканях глаза. В определенных вариантах осуществления промотор представляет собой конститутивный промотор.

[0080] В определенных вариантах осуществления промотор представляет собой CB7 (также называемый промотором CAG) (см. Dinculescu et al., 2005, Hum Gene Ther 16: 649-663, полностью включенный в данный документ посредством ссылки). В некоторых вариантах осуществления промотор CAG (SEQ ID NO:51) или CB7 (SEQ ID NO:50) включает другие элементы регуляции экспрессии, которые усиливают экспрессию трансгена, управляемую вектором. В определенных вариантах осуществления другие элементы регуляции экспрессии включают интрон куриного β -актина и/или поли(A)-сигнал β -глобина кролика (SEQ ID NO:55). В определенных вариантах осуществления промотор содержит ТАТА-бокс. В определенных вариантах осуществления промотор содержит один или более элементов. В определенных вариантах осуществления один или более промоторных элементов могут быть инвертированы или перемещены относительно друг друга. В определенных вариантах осуществления элементы промотора расположены для совместного функционирования. В определенных вариантах осуществления элементы промотора расположены так, чтобы функционировать независимо. В определенных

вариантах осуществления вирусные векторы, представленные в данном документе, содержат один или более промоторов, выбранных из группы, состоящей из промотора немедленно раннего гена CMV человека, раннего промотора SV40, длинного концевой повтора вируса саркомы Рауса (RS) и промотора крысиного инсулина. В определенных вариантах осуществления векторы, представленные в данном документе, содержат один или более промоторов с длинным концевым повтором (LTR), выбранных из группы, состоящей из LTR AAV, MLV, MMTV, SV40, RSV, ВИЧ-1 и ВИЧ-2.

[0081] В определенных вариантах осуществления векторы, представленные в данном документе, содержат один или более тканеспецифичных промоторов (например, специфичный для сетчатки промотор). В конкретных вариантах осуществления вирусные векторы, представленные в данном документе, содержат промотор, специфичный для клеток ткани глаза, такой как промотор родопсинкиназы человека (GRK1) (SEQ ID NO: 54 или 117), промотор аррестина колбочек мыши (CAR) (SEQ ID NO: 114-116), промотор красного опсина человека (RedO) (SEQ ID NO:112) или промотор Best1/GRK (SEQ ID NO:161).

[0082] Предложены регуляторные элементы нуклеиновой кислоты, которые являются химерными в отношении расположения элементов в тандеме в каскаде экспрессии. Регуляторные элементы, в общем, выполняют множество функций в качестве сайтов узнавания для инициации или регуляции транскрипции, координации со специфическим к клеткам механизмом для управления экспрессией при сигналинге и для усиления экспрессии расположенного ниже гена.

[0083] В определенных вариантах осуществления промотор представляет собой индуцируемый промотор. В определенных вариантах осуществления промотор представляет собой индуцируемый гипоксией промотор. В определенных вариантах осуществления промотор содержит сайт связывания индуцируемого гипоксией фактора (HIF). В определенных вариантах осуществления промотор содержит сайт связывания HIF-1 α . В определенных вариантах осуществления промотор содержит сайт связывания HIF-2 α . В определенных вариантах осуществления сайт связывания HIF содержит мотив RCGTG. Для получения подробной информации о расположении и последовательности сайтов связывания HIF см., например, Schödel, et al., Blood, 2011, 117(23):e207-e217, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки. В определенных вариантах осуществления промотор содержит сайт связывания для индуцируемого гипоксией фактора транскрипции, кроме фактора транскрипции HIF. В определенных вариантах осуществления вирусные векторы, представленные в данном документе, содержат один или более сайтов IRES, которые предпочтительно транслируются при гипоксии. Для получения

информации относительно индуцируемой гипоксией экспрессии генов и факторов, участвующих в ней, см., например, Kenneth and Rocha, *Biochem J.*, 2008, 414: 19-29, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки. В конкретных вариантах осуществления индуцируемый гипоксией промотор представляет собой промотор N-WASP человека, см., например, Salvi, 2017, *Biochemistry and Biophysics Reports* 9: 13-21 (включенный посредством ссылки для получения информации о промоторе N-WASP) или индуцируемый гипоксией промотор человеческого EPO, см., например, Tsuchiya et al., 1993, *J. Biochem.* 113:395-400 (включенный посредством ссылки для описания индуцируемого гипоксией промотора EPO). В других вариантах осуществления промотор представляет собой индуцируемый лекарственным средством промотор, например, промотор, который индуцируется введением рапамицина или его аналогов. *См., например, описание индуцируемых рапамицином промоторов в публикациях PCT WO94/18317, WO 96/20951, WO 96/41865, WO 99/10508, WO 99/10510, WO 99/36553 и WO 99/41258 и US 7067526, которые включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте для раскрытия индуцируемых лекарственными средствами промоторов.*

[0084] В данном документе представлены конструкции, содержащие определенные универсальные и тканеспецифические промоторы. Такие промоторы включают синтетические и тандемные промоторы. Примеры и нуклеотидные последовательности промоторов представлены в таблицах 1 и 1a ниже. В таблицу 1 также включены нуклеотидные последовательности других регуляторных элементов, применимых для представленных в данном документе кассет экспрессии.

Таблица 1. Последовательности промотора и других регуляторных элементов

Название/ SEQ ID NO:	Последовательность
CAG/CB7 SEQ ID NO:50	gacattgattattgactagtattataatagtaatacaattacggggtcattagttcatagcccatat atggaggtccgcgttacataacttacggtaaatggcccgcctggctgaccgccaacgac ccccgccattgacgtcaataatgacgtatgttccatagtaacgccaatagggactttcca ttgacgtcaatgggtggagtatttacggtaactgccacttggcagtacatcaagtgtatc atatgccaagtacgccccctattgacgtcaatgacggtaaatggcccgcctggcattatgc ccagtacatgaccttattggactttcctacttggcagtacatctacgtattagtcacgtatt accatggctgaggtgagccccacgttctgcttactctccccatctccccccctccccac cccaattttgtatttatttttaatttttgcagcgatggggcggggggggggggg ggggcgcgccaggcggggcgggggcgggggcgagggcgggggcgggggcgaggc ggagaggtgcgggcgagccaatcagagcggcgctccgaaagtttctttatggcg aggcggcgggcgggcgggccctataaaaagcgaagcgcgcgggcgggcgggagtcg

	<p>ctgcgcgctgccttcgccccgtgccccgctccgcccgcctcgcgccgcccgccccg gctctgactgaccgcgtfactcccacaggtgagcggggcgggacggcccttctcctcgg gctgtaattagccttggttaatgacggctgtttctttctgtggctgctgaaagccttga ggggctccgggagggccctttgtgcggggggagcggctcgggggggtgctgctgctgtg tgtgtgctggggagcggcggctgaggctccgcgctgcccggcggctgtgagcgtgc gggcgcgggcggggcctttgtgcgctccgcagtgtgcgcgaggggagcgcggccgg ggcggtgccccggtgcggggggggctgagggggaacaaggctgctgctgg ggtgtgtgctgggggggtgagcaggggggtgaggcgcgtcggctcgggctgcaacc cccctgcacccccctccccgagttgctgagcacggccccggctcgggtgccccgctcc gtacggggcgtggcgcggggctcggctgcccggggcgggggggtggcgacaggtggg ggtgccccggggcggggccgcctcggggcggggagggtcgggggagggggcg cggcggccccggagcggcggcggctgtcagggcggcggcagccgagccattgcc tttatgtaatcgtgcgagaggcgacgggacttctttgtcccaaatctgtcggagcc gaaatctgggagggcgcggccgacccccctctagcgggcgcgggcgaaagcgggtgcg gcccggcaggaaggaaatggcggggagggccttctgtcgtcggcgcggccgt ccccttctcctctccagcctcggggctgtccgcggggggacggctgccttcggggggg acggggcagggcgggggtcggcttctggcgtgtgaccggcggctctagagcctctgta accatgttcatgccttcttttctacagctcctgggcaacgtgctggttattgtctgtctc atcatttggcaaag</p>
<p>CAG (CMV- промотор куриного бета-актина - химерный интрон) SEQ ID NO:51</p>	<p>gacattgattattgactagtattataatagtaatcaattacggggtcattagttcatagcccatat atggagttccgcgttacataacttacggtaaatggcccgcctggctgaccgccaacgac ccccgccattgacgtcaataatgacgtatgttccatagtaacgccaatagggactttcca ttgacgtcaatgggtggagtatttacggtaaaactcccacttggcagtacatcaagtgtatc atatgccaagtacgccccctattgacgtcaatgacggtaaatggcccgcctggcattatgc ccagtacatgacctatgggacttctacttggcagtacatctacgtattagtcacgctatt accatggtcgaggtgagccccacgttctgcttacttccccatctccccccctccccac cccaattttgtattatttttttaattttttgtgcagcgatggggggcggggggggggggg ggggcgcgcgccaggcggggcggggcggggcggggcggggcggggcggggcggggcggggc ggagaggtgaggcggcagccaatcagagcggcgcgctccgaaagtcttctttatggcg aggcggcggcggcggcggccataaaaagcgaagcgcgcggcggggcggggagtcg ctgcgcgctgccttcgccccgtgccccgctccgcccgcgctcgcgccgcccgccccg gctctgactgaccgcgtfactcccacaggtgagcggggcgggacggcccttctcctcgg gctgtaattagccttggttaatgacggctgtttctttctgtggctgctgaaagccttga ggggctccgggagggccctttgtgcggggggagcggctcgggggggtgctgctgctgtg tgtgtgctggggagcggcggctgaggctccgcgctgcccggcggctgtgagcgtgc</p>

	<p>gggcgcgggcgggggcttgtgcgctccgcagtggtgcgcgaggggagcgcgccgg gggcggtgccccgcggtgcggggggggctgcgaggggaacaaaggctcgtgcgg ggtgtgtcgtgggggggtgagcagggggtgtggcgcgctcggcgggctgcaacc cccctgcacccccctccccgagttgctgagcacggcccggcttcgggtgcggggctcc gtacggggcggtggcgcgggggctcgccgtgccgggagggggggtggcggcaggtggg ggtgccggggcgggggcgggggccgcctcgggcccggggaggggctcgggggagggggcg cggcggccccggagcgccggcggtgtcagggcgggcgagccgcagccattgcc tttatggtaatcgtgcgagaggcgagggacttcctttgtccaaatctgtcggagcc gaaatctgggagggcgcccgcccccttagcgggcgcgggggcgaagcgggtgcg gcgccggcaggaaggaaatgggcggggagggccttcgtgcgtgccgcgcccggt ccccttctccctctccagcctcggggctgtccgcggggggacggctgccttcggggggg acggggcagggcggggttcggcttctggcgtgtgaccggcggtctagagcctctgcta accatgtcatgccttctcttttctacag</p>
--	--

<p>mU1a SEQ ID NO:52</p>	<p>atggaggcgggtactatgtagatgagaattcaggagcaaaactgggaaaagcaactgcttccaatattgtgatt ttacagtgtagttttgaaaaactcttagcctaccaattcttctaagtgttttaaagtgggagccagtacacat gaagttatagagtgtttaaatgaggcctaaatattaccgtaactatgaaatgctacgcatatcatgctgttcaggc tccgtggccacgcaactcatact</p>
<p>EF-1α (коровий) SEQ ID NO:53</p>	<p>gggcagagcgcacatcgcccacagtccccgagaagttggggggaggggtcggcaattgaacgggtgcct agagaaggtggcgcggggtaaactgggaaagtgatgctgtactggctccgcttttcccgagggtggg ggagaaccgtatataagtgcagtagtcgccgtgaacgttcttttcgcaacgggttggccgccaagaacag</p>
<p>UbC человека SEQ ID NO:111</p>	<p>GtctaacaaaaagccaaaaacggccagaatttagcggacaatttactagctaacactgaaAattacatatt gacccaaatgattacatttcaaaaggtgcctaaaaacttcacaaaacacactCgccaaccccagcgcata gtcaaaaccggagcttcagctacttaagaagataggtacataAaccgaccaagaaactgacgcctcact tatccctcccctcaccagaggctccggcgcctgtcgaTtcaggagagcctaccctaggcccgaaccctgcgt cctgcgacggagaaaagcctaccgcacaCctaccggcaggtggccccaccctgattataagccaacaga acgggtgacgtcacgacacgaCgagggcgcgctcccaaaggtacgggtgactgcccaacggcacc gccataactccgcccCgcaacagacgacaaaccgagttctccagtcagtgacaaactcacgtcagggt ccccagatgGtccccagcccactcaccgaataagagcttcccgcattagcgaaggcctcaagacctg ggTtcttggcccccaccatgccccacctgtttcaacgacctcacagcccgcctcacaagcgtcttcCatt caagactcgggaacagccgccattttgctgcgctcccccaacccccagttcagggcaaccTtgctcggg accagactacagcccttggcggctctccacacgcttccgtcccaccgagcggccCggcggccacgaaa gccccggccagcccagagcccgtactaccaagtacgatcacagcgaTccacaacaagaaccgc gacccaaatcccggctgcgacggaactagctgtgccacaccggcgCgtcttataataatcagcgggtca ccgccccacggagatccctccgagaatcgcgagaagggActacttttctcgcctgttccgctctctgga aagaaaaccagtccctagagtcaccaagtcccgtCctaaatgtccttctgatactggggttctaagg ccgagcttatgacagcggccgctgtcctGagcgtccggcggaaggatcaggacgctcgtcgcgcc cttcgtctgactggcagcgtcggcgtgaggagggggcgcccgcgggagggccaaaaaccggcgc ggaggcc</p>

<p>Человеческий опсин (RedO) (фоторецептор- специфический)</p> <p>SEQ ID NO: 112</p>	красный	<pre> ggaggctgaggggtggggaaggcatgggtgttcatgaggacagagcttccgttcatgcaatgaaaag agtttggagacggatgggtgactggactatacacttacacacggtagcgtgtgtacactttgtattatgata tttaccacgatcttttaaaagtgtcaaaaggcaaatggccaatggttcctgtcctatagctgtagcagccatcg gctgttagtgacaaagcccctgagtcaagatgacagcagccccataactcctaateggctctcccgtgg agtcatttaggagtagtgcattagagacaagtccaacatctaatttccaccctggccagggccccagctgg cagcgagggtgggagactccgggcagagcagagggcgctgacattggggcccggcctggcttgggtcc ctctggccttccccagggccctcttcttggggcttcttggccgccactgctcccgtcctctccccca tcccacccctcacccctcgttctcatatccttcttagtgctccctccactttcatccaccctctgcaagagt gtgggaccacaaatgagtttccactggcctggggacacacgtgccccacaggtgctgagtacttttag gacagtaatctgctttaggctaaaatgggacttgatctctgttagccctaataatcaattagcagagccgggga aggtgcagaacctaccgcttccagcctcctccacctctgccacctccactctcttctgggatgtggg ggctggcacacgtgtggcccagggcattgggtggattgcaactgagctgggtcattagcgtaatctggacaa gggcagacagggcgagcggaggggcagctccggggctcaggcaaggctggggctccccagacac cccactcctcctgctggacccccactcatagggcactctgttctcaagggtccaatagcatggtg gccttggatgccaggggaagcctcagagttgcttatctccctctagacagaagggaatctcggtaagagg gagaggctgccctgtcaaggccaccagccagctcatggcgtaatgggacaaggctggccagccatcc caccctcagaagggaccggtggggcaggtgatctcagagagggtcacttctgggtctcacatcttggat ccggttccaggcctcggccctaaatagtctccctgggcttcaagagaaccacatgagaaggaggattcgg gctctgagcagtttaccaccacccccagctgtcaaatcctgaccgtgggtccacctgccccaaaggcg gacgcaggacagtagaagggaacagagaacacataaacacagagaggccacagcggctcccacagtc accgccacttctggcggggatgggtggggcgtctgagtttgggtcccagcaaatccctctgagccgcct tgcgggctgcctcaggagcaggggagcaagaggtgggaggaggaggtctaagtcccaggccaattaa gagatcaggtagtagggttgggagctttaaaggagaagggccggctgatcccacagggcagataa agcggcgtgaccctcaggtgatcgccagggccggctgccgtcggggacagggctttccatagcc </pre>
--	---------	--

<p>Человеческий родопсин (Rho) (фоторецептор-специфический)</p> <p>SEQ ID NO:113</p>	<pre> Agatctcccc a cctagccacc tggcaactg ctccttctct caaaggccca aacatggcct cccagactgc aacccccagg cagtcaggcc ctgtctccac aacctcacag ccaccctgga cggaatctgc ttctccac atttgagtcc tctcagccc ctgagctcct ctgggcaggg ctgtttctt ccatctttgt attcccaggg gcctgcaaat aaatgtttaa tgaacgaaca agagagtgaa ttccaattcc atgcaacaag gattgggctc ctgggccta ggctatgtgt ctggcaccag aaacggaagc tgcaggttgc agcccctgcc ctcattggagc tctcctgtc agaggagtgt ggggactgga tgactccaga ggtaacttgt gggggaacga acaggttaagg ggctgtgtga cgagatgaga gactgggaga ataaaccaga aagtctctag ctgtccagag gacatagcac agaggcccat ggtccctatt tcaaaccag gccaccagac tgagctggga ccttgggaca gacaagtcat gcagaagtta ggggacctc tctccttt tcttgatgg atcctgagta ccttctctc cctgacctca ggcttctcc tagtgtcacc ttggcccctc ttagaagcca attaggccct cagtttctgc agcggggatt aatatgatta tgaacacccc caatctcca gatgctgatt cagccaggag cttaggaggg ggaggtcact ttataagggt ctgggggggt cagaaccag agtc (начало экзона 1 с 5339; см. также Bennett,J., Sun,D. and Kariko,K. Sequence analysis of the 5.34-kb 5' flanking region of the human rhodopsin- encoding gene. Gene 167 (1-2), 317-320 (1995)) </pre>
--	--

<p>Промотор арестина колбочек мыши (CAR) <i>(фоторецептор- специфический)</i></p> <p>SEQ ID NO:114</p>	<p>TGGCCCTGGCATTCCCCTATACTGGGACATAGAACCTT CACAGGACCAAGGGCCTCTCCTCCCATTGATGACTGA CTAGGCCATCCTCTAGCTACATAGGTGGTGGAGCCTA GAGTCCCTCCTTGTGTA CTCTTTGGTGGTGGT TACTCT GGGGTACTAGGTTAGTTCGTATTGTTGTTCCCTCCTAG GGGACTGCAAACCCCTTCAGCTCCTTGGGTCCTTTCTC TAGTTCCTTCTTTGGGGACCCTGTGCTCAGTTCAATGG ATGGCCAATTCCTTCTTAAATGCCCTAGCAGTAACT GTTAGGTCTCAATCCCAAGACAAATGTCTGAGGTGCC TATTTAACAGATCAAAGCGGACCTGTCCTCAGGTAA CCCAGTCACTCCCTGTACCTCAGTCCCTACCCATCACA ATTCTCCAGCCCATGAGCTTCGGGCTGTACTTCCCCAA CGGGTTCTCCCATTTTGGGTACATGGCCTTTTTTTTTTA CCTTTTTGGTTCCTTTGGCCTTTTGGCTTTTGGCTTCCA GGGCTTCTGGATCCCCCCAACCCCTCCCATA CACA TACACATGTGCACTCGTGCACTCAACCCAGCACAGGA TAATGTTCAATTCTTGACCTTTCCACATACATCTGGCTA TGTTCTCTCTTATCTACAATAAATCTCCTCCACTATA CTTAGGAGCAGTTATGTTCTTCTTCTTTCTTTCTTTTTT TTTTTTTTTTCATTCAGTAACATCATCAGAATCCCCTA GCTCTGGCCTACCTCCTCAGTAACAATCAGCTGATCC CTGGCCACTAATCTGTA CTCACTAATCTGTTTTCCA AACTCTTGGCCCCTGAGCTAATTATAGCAGTGCTT CATGCCACCCACCCCAACCCCTATCCTTGTTCTCTGA CTCCCATAATCTACACATTCAGAGGATTGTGGAT ATAAGAGGCTGGGAGGCCAGCTTAGCAACCAGAGC TCGAGGCTGATGCGAGCTTCATCTCTTCCCTC</p>
---	---

<p>Промотор аррестина колбочек мыши (CAR) <i>(фоторецептор- специфический)</i> SEQ ID NO:115</p>	<p>TTTTTTTTTTACCTTTTTGGTTCCTTTGGCCTTTTGGCTT TTGGCTTCCAGGGCTTCTGGATCCCCCAACCCCTCC CATACACATACACATGTGCACTCGTGCACTCAACCCA GCACAGGATA ATGTTCAATTCTTGACSTTTCCACATACATCTGGCTATG TTCTCTCTTTATCTACAATAAATCTCCTCCACTATACT TAGGAGCAGTTATGTTCTTCTTTCTTTCTTTTTTTTT TTTTTTTTTCATTCAGTAACATCATCAGAATCCCCTAGC TCTGGCCTACCTCCTCAGTAACAATCAGCTGATCCCT GGCCACTAATCTGTACTCACTAATCTGTTTTCCAAA CTCTTGGCCCCTGAGCTAATTATAGCAGTGCTTCA TGCCACCCACCCCAACCCTATCCTTGTTCTCTGACT CCCACTAATCTACACATTCAGAGGATTGTGGATAT AAGAGGCTGGGAGGCCAGCTTAGCAACCAGAGCTC GAGGCTGATGCGAGCTTCATCTCTTCCCTC</p>
<p>Промотор аррестина колбочек мыши (CAR) <i>(фоторецептор- специфический)</i> SEQ ID NO:116</p>	<p>TGATCCCTGGCCACTAATCTGTACTCACTAATCTGT TTTCCAAACTCTTGGCCCCTGAGCTAATTATAGCA GTGCTTCATGCCACCCACCCCAACCCTATCCTTGTT CTCTGACTCCCACTAATCTACACATTCAGAGGATTG TGGATATAAGAGGCTGGGAGGCCAGCTTAGCAACC AGAGCTCGAGGCTGATGCGAGCTTCATCTCTTCCC TC</p>
<p>Человеческая родопсинкиназа (RK) или GRK1 <i>(фоторецептор- специфическая)</i> SEQ ID NO:117</p>	<p>gggcccc gaagcctggt ggtgtttgt ccttctcagg ggaaaagtga ggcggcccct tggaggaagg ggccgggcag aatgatctaa tcggattcca agcagctcag gggattgtct tttctagca ccttcttgcc actcctaage gtectccgtg accccggctg ggatttagcc tgggtctgtg tcagccccgg</p>

<p>Промотор человеческого бестрофина 1 (BEST1) <i>(также известный как промотор hVMD2)</i> SEQ ID NO:118</p>	<p>AAGG ACTCCTTTGT GGAGGTCCTG GCTTAGGGAG TCAAGTGACG GCGGCTCAGC ACTCACGTGG GCAGTGCCAG CCTCTAAGAG TGGGCAGGGG CACTGGCCAC <u>A</u>GAGTCCCAG GGAGTCCCAC CAGCCTAGTC GCCAGACC +38</p>
<p>Промотор человеческого бестрофина 1 (BEST1) <i>(также известный как промотор hVMD2)</i> SEQ ID NO:119</p>	<p>GTCAAGTGACG GCGGCTCAGC ACTCACGTGG GCAGTGCCAG CCTCTAAGAG TGGGCAGGGG CACTGGCCAC <u>A</u>GAGTCCCAG GGAGTCCCAC CAGCCTAGTC GCCAGACC (остаток сайта начала транскрипции подчеркнут при +1)</p>
<p>Промотор человеческого бестрофина 1 (BEST1) <i>(также известный как промотор hVMD2)</i> SEQ ID NO:120</p>	<p>CTCAGC ACTCACGTGG GCAGTGCCAG CCTCTAAGAG TGGGCAGGGG CACTGGCCAC <u>A</u>GAGTCCCAG GGAGTCCCAC CAGCCTAGTC GCCAGAC (остаток сайта начала транскрипции подчеркнут при +1)</p>

Промотор человеческого бестрофина 1 (BEST1) (также известный как промотор hVMD2) SEQ ID NO:121	TTAATAAACA	TTTGGGCGAT	TCTTACGGCC
	TCTAAAGACC	AAGAACCACT	GCTGCCTAGA
	GCTCTGCTCT	CTTCATTGAA	CAATACAAGA
	GGAGTGTGTA	GGTAGACACC	CACCACTTCC
	AACAGCTTAG	GAGAGCCCTT	GAGTATGGAT
	TGATGTATTA	AAATTTATTG	AATCACATGC
	TGAGATTTTC	ACCAGCTGCC	CGTGGGGATC
	TGGGCATTTA	TTCCCATATT	GCACTGGCTG
	GCTGGAAGCC	AGCAGCATAA	ACTCCAGGGC
	TGTTCTGTCA	ACCCCAACCA	GACTCACCCC
	GCTCCACCAG	CCCCGGCAGG	CTTCTCCTTC
	CATCTCTCTG	AAGCAACTTA	CTGATGGGCC
	CTGCCAGCCA	ATCACAGCCA	GAATAACGTA
	TGATGTCACC	AGCAGCCAAT	CAGAGCTCCT
	CGTCAGCATA	TGCAGAATTC	TGTCATTTTA
	CTAGGGTGAT	GAAATTCCCA	AGCAACACCA
	TCCTTTTCAGATAAGGGCAC		TGAGGCTGAG
	AGAGGAGCTG	AAACCTACCC	GGCGTCACCA
	CACACAGGTG	GCAAGGCTGG	GACCAGAAAC
	CAGGACTGTT GACTGCAGCC CGGTATTCAT		
	TCTTTCCATA	GCCCACAGGG	CTGTCAAAGA
	CCCCAGGGCC	TAGTCAGAGG	CTCCTCCTTC
	CTGGAGAGTT	CCTGGCACAG	AAGTTGAAGC
	TCAGCACAGC	CCCCTAACCC	CCAACTCTCT
	CTGCAAGGCC	TCAGGGGTCA	GAACACTGGT
	GGAGCAGATC	CTTTAGCCTC	TGGATTTTAG
	GGCCATGGTA	GAGGGGGTGT	TGCCCTAAAT
	TCCAGCCCTG	GTCTCAGCCC	AACACCCTCC
	AAGAAGAAAT	TAGAGGGGCC	ATGGCCAGGC
	TGTGCTAGCC	GTTGCTTCTG	AGCAGATTAC
	AAGAAGGGAC	CAAGACAAGG	ACTCCTTTGT
	GGAGGTCCTG	GCTTAGGGAG	TCAAGTGACC
	GCGGCTCAGC	ACTCACGTGG	GCAGTGCCAG
CCTCTAAGAG	TGGGCAGGGG	CACTGGCCAC	

	<p><u>AGAGTCCCAG</u> <u>GGAGTCCCAC</u> <u>CAGCCTAGTC</u> <u>GCCAGACCTT</u> CTGTGGGATC ATCGGACCCA</p> <p>(остаток сайта начала транскрипции подчеркнут при +1; область минимального активного промотора выделена жирным шрифтом)</p>
Промотор GRK1 SEQ ID NO:54	GGGCCCCAGAAGCCTGGTGGTTGTTTGCCTTCTCAGGGGAAAAG TGAGGCGGCCCTTGGAGGAAGGGCCGGGCAGAATGATCTAAT CGGATTCCAAGCAGCTCAGGGGATTGTCTTTTTCTAGCACCTTCTT GCCACTCCTAAGCGTCCTCCGTGACCCCGGCTGGGATTTAGCCTG GTGCTGTGTCAGCCCCGGGCTCCCAGGGGCTTCCCAGTGGTCCCC AGGAACCCTCGACAGGGCCAGGGCGTCTCTCTCGTCCAGCAAGG GCAGGGACGGGCCACAGGCCAAGGGC
Расположенная выше последовательность Козак	GCCACC
Поли(А)-область бета- глубина кролика SEQ ID NO:55	gatctttttccctctgccaaaaattatggggacatcatgaagccccttgagcatctgactctggctaataaagg aaatttttttcattgcaatagtgtgttggaaatttttgtctctcactcg
Химерный интрон SEQ ID NO:56	gtaagtatcaaggttacaagacaggttaaggagaccaatagaaactgggctgtcgagacagagaagactc ttgcgtttctgataggcactattggtcttactgacatccactttgcctttctccacag
Интрон VH4 SEQ ID NO:57	gtgagtatctcaggatccagacatggggatatgggaggtgcctctgatcccagggtcactgtgggtctctc tgttcacag
Интрон SV40 SEQ ID NO:157	gtaagtttagtcttttgtctttatttcaggtcccggatccgggtggtgcaaatcaaagaactgctcctcagtg gatgtgcccttactctag
5' ITR SEQ ID NO:58	ctgcgcgctcgctcgctcactgaggcggcccgggcaaagcccgggctcgggcgacctttggtcgcccgg cctcagtgagcgagcgagcgcgcagagagggagtggccaactccatcactaggggtcct
5' -ITR (Удалена D- последовательность для самокомплементарного AAV) SEQ ID NO:59	ctgcgcgctcgctcgctcactgaggcggcccgggcaaagcccgggctcgggcgacctttggtcgcccgg cctcagtgagcgagcgagcgcgcagagagggagtgg

3'-ITR AAV SEQ ID NO:60	gaaccctagtgatggagttggccactccctctctgcgcgctcgtcactgaggccgccgggcaaa gcccgggctcgggacaccttggcgcgccggccicagtgagcgagcgagcgcgcagagaggagtg cca
3'-ITR (Удалена D- последовательность для самокомплементарного AAV) SEQ ID NO:61	ttggccactccctctctgcgcgctcgtcactgaggccggcgaccaaggctcggcgacggcgg gcttggccggggcgccctcagtgagcgagcgagcgcgcag
Промотор CB SEQ ID NO:159	gacgacattgattattgactagttattaatagtaataacacggggtcattagttcatagcccatataggagtc cgcggtacataactacggtaaatggcccgcctggctgaccgccaacgacccccgccattgacgtcaata atgacgtatgtcccatagtaacccaatagggacttccattgacgtcaatgggtggagtattacggtaact gcccacttggcagtacatcaagtgtatcatatccaagtacggcccctattgacgtcaatgacggtaaatggc ccgctggcattatcccaglacatgaccttatgggacttctacttggcagtacatctacgtattatgcatcgc tattaccatggtcaggtgagccccacgttctgcttactctccccatctccccccccccccacccccat gtattattatttttaattatttgcagcgatggggcgggggggggggggggggcgcgccaggcggg gccccggggcgagggcgggggcgggggcgagggcgagaggtcggcgccagccaatcagagcgg cgcgctccgaaagtctctttatggcgagggcgggcgggcgggccctataaaaagcgaagcgcgcg cgggcgg
Промотор CBLong (CB+100) SEQ ID NO:160	gacgacattgattattgactagttattaatagtaataacacggggtcattagttcatagcccatataggagtc cgcggtacataactacggtaaatggcccgcctggctgaccgccaacgacccccgccattgacgtcaata atgacgtatgtcccatagtaacccaatagggacttccattgacgtcaatgggtggagtattacggtaact gcccacttggcagtacatcaagtgtatcatatccaagtacggcccctattgacgtcaatgacggtaaatggc ccgctggcattatcccaglacatgaccttatgggacttctacttggcagtacatctacgtattatgcatcgc tattaccatggtcaggtgagccccacgttctgcttactctccccatctccccccccccccacccccat gtattattatttttaattatttgcagcgatggggcgggggggggggggggggcgcgccaggcggg gccccggggcgagggcgggggcgggggcgagggcgagaggtcggcgccagccaatcagagcgg cgcgctccgaaagtctctttatggcgagggcgggcgggcgggccctataaaaagcgaagcgcgcg cgggcgggagtcgctgcgcgctgccttgcggcgctcccgctccggcgccctgcgccggcgccg cggctctgactgaccggtactcccacaggtgagcg

<p>Тандемный промотор Best1/GRK1 SEQ ID NO:161</p>	<p>GTCGACAAATTCTGTCATTTTACTAGGGTGATGAAATTCCCAAGC AACACCATCCTTTTCAGATAAGGGCACTGAGGCTGAGAGAGGAG CTGAAACCTACCCGGGGTCACCACACACAGGTGGCAAGGCTGGG ACCAGAAACCAGGACTGTTGACTGCAGCCCGGTATTCATCTTTTC CATAGCCCACAGGGCTGTCAAAGACCCCAGGGCCTAGTCAGAGG CTCCTCCTCCTGGAGAGTTCCTGGCACAGAAGTTGAAGCTCAGC ACAGCCCCCTAACCCCAACTCTCTCTGCAAGGCCTCAGGGGTCA GAACACTGGTGGAGCAGATCCTTTAGCCTCTGGATTTTAGGGCCA TGGTAGAGGGGGTGTGGCCCTAAATTCAGCCCTGGTCTCAGCCC AACACCCTCCAAGAAGAAATTAGAGGGGCCATGGCCAGGCTGTG CTAGCCGTTGCTTCTGAGCAGATTACAAGAAGGGACTAAGACAA GGACTCCTTTGTGGAGGTCCTGGCTTAGGGAGTCAAGTGACGGCG GCTCAGCACTCACGTGGGCAGTGCCAGCCTCTAAGAGTGGGCAG GGCACTGGCCACAGAGTCCCAGGGAGTCCCACCAGCCTAGTCG CCAGACTAGAGGGCCCCAGAAGCCTGGTGGTTGTTTGTCTTCTC AGGGGAAAAGTGAGGCGGCCCTTGGAGGAAGGGGCCGGGCAG AAGATCTAATCGGATTCCAAGCAGCTCAGGGGATTGTCTTTTTCT AGCACCTTCTTGCCACTCCTAAGCGTCCTCCGTGACCCCGGCTGG GATTTAGCCTGGTGCTGTGTCAGCCCCGGGCTCCCAGGGGCTTCC CAGTGGTCCCAGGAACCCTCGACAGGGCCAGGGCGTCTCTCTCG TCCAGCAAGGGCAGGGACGGGCCACAGGCCAAGGGCCTTAAGC</p>
--	--

Таблица 1а. Другие регуляторные последовательности

<p>LSPX1 SEQ ID NO:122</p>	<p>aggtaatttttaaaaagcagtcaaaagccaagtggccctggcagcatttacticctctgtttgctctggtaat aatctcaggagcacaacattccagatccaggtaatttttaaaaagcagtcaaaagccaagtggccctggc agcatttacticctctgtttgctctggttaataatctcaggagcacaacattccagatccggcgcgccagggt ggaagctaccttgtctagaaggctcagaggcacacaggagttctgggctcacctgccccctccaacct tcagttccatctccagcagctgtttgtgtgctgcctctgaagtcacactgaacaaactcagcctactcatgt ccctaaaatgggcaaacattgcaagcagcaaacagcaaacacacagccctccctgctgctgacctggag ctggggcagaggtcagagacctctctggcccatgccacctcaacatccactgaccttggaaattcgg tggagaggagcagaggtgtcctggcgtggttaggtagtgtagagagggtaccggggtcttctacca gtggaacagccactaaggattctgcagtgagagcagaggccagctaagtggactctcccagagactgtct gactcacgccccctccacctggacacaggacgctgtggtttctgaccaggtacaatgactccttccg taagtgcagtggagctgtacactgcccaggcaagcgtccgggcagcgtaggcgggactcagatccc agccagtgacttagccccgtttgctcctccgataactggggtgaccttggtaatattcaccagcagcctcc cccgttccccctctgcatccactgctaaataggacgaggacaggccctgtctctcagctttagccacca ccactgacctgggacagt</p>
<p>LSXP2 SEQ ID NO:123</p>	<p>aggctcagaggcacacaggagttctgggctcacctgccccctccaacctcagttc ccatcctccagcagctgtttgtgtgctgcctctgaagtcacactgaacaaactcagccta ctcatgtccctaaaatgggcaaacattgcaagcagcaaacagcaaacacacagccctcc ctgctgctgaccttggagctggggcagaggtcagagacctctctggcccatgccacct</p>

	<p>ccaacatccactcgacccttgggaattcggaggagaggagcagaggtgtcctggcgtg gtttaggtagtgtgagagggcttagaaggctcagaggcacacaggagtttctgggctcac cctgcccccttcaaccctcagttccatcctccagcagctgtttgtgtgctcctctgaa gtccacactgaacaaactcagcctactcatgtccctaaaatgggcaaacattgcaagcag caaacagcaaacacacagccctccctgctgctgacctggagctggggcagaggtca gagacctctctgggcccattgccacctcaacatccactcgacccttgggaattcgggtgga gaggagcagaggtgtcctggcgtggtttaggtagtgtgagaggggtaccggggatctt gctaccagtggaacagccactaaggattctgcagtgagagcagagggccagctaagtg gtactctcccagagactgtctgactcacgccacccctccacctggacacaggacgctg tggtttctgagccaggtacaatgactccttcggtaagtgcagtggaagctgtactgccc aggcaaagcgtccgggcagcgtaggcgggcgactcagatcccagccagtggttag ccctgtttgctcctccgataactgggggtgacctgggtaataaccaggcagcctcccc gttgcctcttgatccactgcttaatacggacgaggacaggccctgtctcctcagctt caggcaccactgacctgggacagt</p>
<p>LTP1 SEQ ID NO:124</p>	<p>aggtaattttaaaagcagcctcaaaagccaagtggcccttggcagcatttactctctgtt tgctctggtaataatctcaggagcacaaacattccagatccaggtaattttaaaagcag tcaaaagccaagtggcccttggcagcatttactctctgtttgctctggttaataatctcag gagcacaacattccagatccggcgcgccagggtggaagctaccttgacatcatttct ctgccaatgcatgtataattctacagaacctattagaaaggatcaccagcctctgctttgt acaactttcccttaaaaaactccaattccactgctgittggcccaatagtgagaacttttcc tgctgcctcttggtgctttgcctatggccctattctgctgctgaagacactcttgccagca tgacttaaacctccagctctgacaatcctctttctttgtttacatgaagggtctggca gccaagcaatcactcaaagttcaaacctatcatttttctttgttctcttggccttggttt gtacatcagctttgaaaatacatccagggttaatgctgggggttaattataactaagagtg ctctagtttgcaatacaggacatgctataaaaatggaaagatgttcttctgagaggatctt gctaccagtggaacagccactaaggattctgcagtgagagcagagggccagctaagtg gtactctcccagagactgtctgactcacgccacccctccacctggacacaggacgctg tggtttctgagccaggtacagtgactccttcggtaagtgcagtggaagctgtactgccc aggcaaagcgtccgggcagcgtaggcgggcgactcagatcccagccagtggttag ccctgtttgctcctccgataactgggggtgacctgggtaataaccaggcagcctcccc gttgcctcttgatccactgcttaatacggacgaggacaggccctgtctcctcagctt caggcaccactgacctgggacagt</p>
<p>LTP2 SEQ ID NO:125</p>	<p>aggctcagaggcacacaggagtttctgggctcacctgcccccttcaaccctcagttc ccatcctccagcagctgtttgtgtgctcctctgaagtccactgaacaaactcagccta</p>

	<p>ctcatgtccctaaaatgggcaaacattgcaagcagcaaacagcaaacacacagccctcc ctgcctgctgacctggagctggggcagaggtcagagacctctctgggccatgccacct ccaacatccactcgaccccttggaaattcggaggagaggagcagaggtgtcctggcgtg gtttaggtagtgtgagagggtctagagcccttaagctagcaggttaattttaaaaagcagt caaaagtccaagtggcccttggcagcattactctctctgtttgctctggtaataatctcagg agcacaacattccagatccaggtaattttaaaaagcagcaaaagtccaagtggccctt ggcagcattactctctctgtttgctctggtaataatctcaggagcacaacattccagatcc ggcgcgccagggtggaagctacctttgacatcatttctctgcgaatgcatgtataattct acagaacctattagaaggatcaccagcctctgctttgtacaactttcccttaaaaaactg ccaattccactgctgtttggccaatagtgagaacttttctgctgcctcttggctgtttgcc tatggccctattctgctgctgaagacactcttggcagcatggacttaaacccctccagct ctgacaatcctctttcttttgtttacatgaagggtctggcagccaaagcaatcactcaaag ttcaaaccttatcattttgtttgtcctcttggccttggttttgtacatcagctttgaaaatacc atcccagggtaatgctggggtaattataactaagagtctctagtttgcaatacaggac atgctataaaaatggaaagatgttctttctgagaggatcttctaccagtggaacagccac taaggattctgcagtgagagcagagggccagctaagtggactctcccagagactgtctg actcacgccacccctccacctggacacaggacgctgtggtttctgagccaggtacagt gactcctttcgtaagtgcagtggaagctgtactgcccaggcaaacgctccggggcag cgtaggcggggcactcagatcccagccagtggacttagccctgtttgctcctccgataa ctgggggtgaccttggtaataatccaccagcagcctccccgttggccctctggatccactgc ttaatacggacgaggacagggccctgtctcctcagcttcaggcaccaccactgacctgg gacagt</p>
<p>LTP3 SEQ ID NO:126</p>	<p>aggtaattttaaaaagcagcaaaagtccaagtggcccttggcagcattactctctctgtt tgctctggtaataatctcaggagcacaacattccagatccaggtaattttaaaaagcag tcaaaagtccaagtggcccttggcagcattactctctctgtttgctctggtaataatctcag gagcacaacattccagatccggcgcgccagggtggaagctacctttgacatcatttct ctgcgaatgcatgtataatttctacagaacctattagaaggatcaccagcctctgctttgt acaactttcccttaaaaaactgccaattccactgctgtttggccaatagtgagaacttttcc tgctgcctcttggctgttttgcctatggcccctattctgctgctgaagacactcttggcaga tggacttaaacctccagctctgacaatcctctttctttttacatgaagggtctggca gccaagcaatcactcaaagtcaaaccttatcattttgtttgtcctcttggccttggttt gtacatcagctttgaaaataccatcccagggtaatgctggggtaattataactaagagtg ctctagtttgcaatacaggacatgctataaaaatggaaagatgttcttctgagaggatctt gctaccagtggaacagccactaaggattctgcagtgagagcagagggccagctaagtg gtactctcccagagactgtctgactcacgccacccctccaccttggacacaggacgctg</p>

	<p> tggtttctgagccaggtacagtgactccttcggttaagtgcagtggaagctgtactgccc aggcaaagcgtccgggcagcgtaggcgggcgactcagatcccagccagtgacttag cccctgtttgctcctccgataactggggtgacctgggtaataaccaccagcagcctcccc gttgcctctggtatccactgcttaatacggacgaggacagggccctgtctcctcagctt caggcaccactgacctgggacagtaaacaggttaagtccgctgtttgtgtgctgct ctgaagtccacactgaacaaactcagcctactcatgtccctaaaatgggcaaacattgca agcagcaaacagcaaacacacagccctccctgctgctgacctggagctggggcaga ggtcagagacctctctggccttactaaccatgttcatgtttcttttttctacaggtctgg gtgacgaacag </p>
<p> LMTP6 SEQ ID NO:127 </p>	<p> aggctcagaggcacacaggagtttctgggctcacctgccccctccaaccctcagttc ccatcctccagcagctgtttgtgtgctgctctgaagtccacactgaacaaactcagccta ctcatgtccctaaaatgggcaaacattgcaagcagcaaacacacagccctcc ctgctgctgacctggagctggggcagaggtcagagacctctctgggccatgccacct ccaacatccactgaccccttgaatttcggtggagaggagcagaggtgtcctggcgtg gtttaggtagtgtgagagggccactacgggttaggctgccatgtaaggaggcaaggc ctggggacacccgagatgcctggtataattaaccagacatgtggctgcccccccccc cccaacacctgctgctctaaaaataaccctgtccctggtggatccactacgggttagg ctgccccatgtaaggaggcaaggcctggggacacccgagatgcctggtataattaacc agacatgtggctgcccccccccccccaaacctgctgctctaaaaataaccctgtcct ggtggatcccactacgggttaggctgccatgtaaggaggcaaggcctggggacaccc gagatgcctggtataattaaccagacatgtggctgcccccccccccccaaacctgct gctctaaaaataaccctgtcctggtggatcccctgcatgcgaagatcttgaacaaggc tgtgggggactgagggcaggctgtaacaggcttgggggacaggcttatactgctgctg gactcccaaagtattactgttccatgttcccggcgaaggccagctgtccccgccagcta gactcagcacttagtttaggaaccagtgaagcaagtcagcccttggggcagccatacaag gccatggggctgggcaagctgcacgcctgggtccgggtggggcacgggtgccggggca acgagctgaaagctcatctgctctcaggggccctccctggggacagccctcctggcta gtcacacctgtaggtcctctataataaccaggggcacaggggtgccctcattctacca ccacctccacagcacagacagacactcaggagccagccagcgtcgagatcttgctacca gtggaacagccactaaggattctgcagtgaagcagagggccagctaaagtgtactctc ccagagactgtctgactcacgccccctccacctggacacaggacgctgtggttctg agccaggtacagtgactccttcggttaagtgcagtgggaagctgtactgcccaggcaaa gctccgggcagcgtaggcgggcgactcagatcccagccagtgacttagccctgtt gctcctccgataactggggtgacctgggtaataaccaccagcagcctccccgttgcctc </p>

	ctggatccactgcttaataacggacgaggacagggcctgtctcctcagcttcaggcacc accactgacctgggacagt
LMTP13 SEQ ID NO:128	aggctcagaggcacacaggagtttctgggctcacctgccccctccaaccctcagttc ccatcctccagcagctgtttgtgtgctgcctctgaagtccacactgaacaaactcagccta ctcatgtccctaaaatgggcaaacattgcaagcagaaacagcaaacacacagccctcc ctgctgctgacctggagctggggcagaggtcagagacctctctgggccatgccacct ccaacatccactcgaccccttggaaattcggaggagaggagcagaggtgtcctggcgtg gtttaggtagtgtagaggggtaccggggatcttgctaccagtctagaggccgtccgcc ctcggcaccatcctcacgacacccaatatggcgacgggtgaggaatggtggggagtta tttttagagcggtaggaagggtgggcaggcagcaggtgtggcgtctaaaataactcc cgggagttattttagagcggaggaatggtggacacccaatatggcgacggttcctcac ccgtcgccatatttgggtgtccgcctcggccggggccgcattcctgggggcccgggccc tgctcccggcctcgataaaaggctccggggccggcggcggcccacgagctaccc ggaggagcgggagggcgaagcgtgagtatcgatcttgctaccagtggaaacagccact aaggattctcagtgagagcagagggccagctaagtgtactctccagagactgtctga ctcacgccacccctccacctggacacaggacgctgtggttctgagccaggtacagtg actccttcggtaagtgcagtggaagctgtacactgccaggcaaacgctccgggcagc gtaggcggggcactcagatcccagccagtggacttagcccctgtttgctcctccgataact ggggtgaccttggtaatatccaccagcagcctccccgttggccctctggatccactgctt aaatacggacgaggacagggcctgtctcctcagcttcaggcaccaccactgacctggg acagt
LMTP14 SEQ ID NO:129	gaatggtggacacccaatatggcgacggttcctacccgtcgccatatttgggtgtccgc cctcggccggggccgcattcctgggggcccgggcccgtgctcccggcgcctcgataaaa ggctccggggcccggcggcggcccacgagctacccggaggagcgggagggcgaag cgatcttgctaccagtggaaacagccactaaggattctcagtgagagcagagggccagc taagtgtactctccagagactgtctgactcacgccacccctccacctggacacagg acgctgtggttctgagccaggtacagtgactccttcggtaagtgcagtggaagctgtac actgccaggcaaacgctccgggcagcgtaggcggggcactcagatcccagccagtg gacttagcccctgtttgctcctccgataactggggtgaccttggtaatatccaccagcagc ctccccgttggccctctggatccactgctaaatacggacgaggacagggcctgtctcc tcagcttcaggcaccaccactgacctgggacagt
LMTP15 SEQ ID NO:130	aggctcagaggcacacaggagtttctgggctcacctgccccctccaaccctcagttc ccatcctccagcagctgtttgtgtgctgcctctgaagtccacactgaacaaactcagccta ctcatgtccctaaaatgggcaaacattgcaagcagaaacagcaaacacacagccctcc ctgctgctgacctggagctggggcagaggtcagagacctctctgggccatgccacct

	<p>ccaacatccactcgacccttggaaattcggaggagaggagcagaggtgtcctggcgtg gtttaggtagtgtgagagggtctagagaatggtggacacccaaatattggcgacggttcct caccgctcgccatatttgggtgtccgccctcggccggggccgcattcctgggggcccggg cgggtgtcccggcctcgataaaaaggctccggggccggcggcggccacgagcta cccggaggagcgggaggcgccaagcgatcttgctaccagtggaacagccactaaggat tctgcagtgagagcagaggccagctaagtggactctcccagagactgtctgactcacg ccacccctccaccttgacacaggacgctgtggtttctgagccaggtacagtgactcct tcggtaatgacgtggaagctgtacactgccaggcaaagcgtccgggcagcgtaggc gggcgactcagatcccagccagtgacttagccccgtttgctcctccgataactggggt gaccttggtaataatcaccagcagcctccccgttggccctctggatccactgcttaatac ggacgaggacagggccctgtctcctcagcttcaggcaccaccactgacctgggacagt</p>
<p>LMTP18 SEQ ID NO:131</p>	<p>aggctcagaggcacacaggagtttctgggctcacctgccccctccaaccctcagttc ccatcctccagcagctgtttgtgtgctgcctctgaagtccacactgaacaaactcagccta ctcatgtccctaaaatgggcaaacattgcaagcagcaaacagcaaacacacagccctcc ctgctgtgaccttggagctggggcagaggtcagagacctctctgggccatgccacct ccaacatccactcgacccttggaaattcggaggagaggagcagaggtgtcctggcgtg gtttaggtagtgtgagaggccactacgggtttaggctgccatgtaaggaggcaaggc ctggggacaccgagatgcctggttataattaaccagacatgtggctgcccccccccc cccaacacctgctgcctctaaaataaccctgtccctggatccctgcatgcaagat cttcgaacaaggctgtgggggactgaggcaggctgtaacaggcttggggccagggc ttatacgtgcctgggactccaaagtattactgttccatgttccggcgaaggccagctgt ccccgccagctagactcagcacttagtttaggaaccagtgagcaagtcagcccttgggg cagccatacaaggccatggggctgggcaagctgcacgcctgggtccggggtgggca cgggtcccgggcaacgagctgaaagctcatctgctctcaggggccccctcctggggac agccctcctggctagtacacacctgtaggctcctctatataaccaggggcacaggggc tgccctcattctaccaccctccacagcacagacagacactcaggagccagccagcgt cgagatcttgctaccagtggaacagccactaaggattctgcagtgagagcagaggcca gctaagtgtactctcccagagactgtctgactcacgccccccctccaccttgacaca ggacgctgtggtttctgagccaggtacagtgactcctttcggttaagtgcagtggaaagctgt aactgccaggcaaagcgtccgggcagcgtaggcgggcgactcagatcccagccag tgacttagccccgtttgctcctccgataactggggtgaccttggtaataatcaccagcag cctccccgttggccctctggatccactgcttaatacggacgaggacagggccctgtctc ctcagcttcaggcaccaccactgacctgggacagt</p>
<p>LMTP19 SEQ ID NO:132</p>	<p>aggctcagaggcacacaggagtttctgggctcacctgccccctccaaccctcagttc ccatcctccagcagctgtttgtgtgctgcctctgaagtccacactgaacaaactcagccta</p>

	<p>ctcatgtccctaaaatgggcaaacattgcaagcagcaaacagcaaacacacagccctcc ctgcctgctgacctggagctggggcagaggtcagagacctctctgggccatgccacct ccaacatccactcgaccccttgaatttcggtggagaggagcagaggtgtcctggcgtg gtttaggtagtgtgagagggccctgcatgcaagatcttgaacaaggctgtgggggact gagggcaggctgtaacaggcttgggggcccagggttatacgtgcctgggactcccaaa gtattactgttccatgttcccggcgaaggccagctgtccccgccagctagactcagca cttagtttaggaaccagtgagcaagtacagcccttggggcagcccatacaaggccatggg gctgggcaagctgcacgcctgggtccgggtggggcacgggtgccgggcaacgagctg aaagctcatctgctctcaggggcccctccctggggacagcccctcctggctagtacacc ctgtaggctcctatataaccaggggcacaggggctgcctcattctaccaccactcc acagcacagacagacactcaggagccagccagcgtcgagatcttctaccagtggaac agccactaaggattctgcaagtgagagcagagggccagctaagtggactctccagaga ctgtctgactcacgcccccctccacctggacacaggacgctgtggtttctgagccag gtacagtgactccttcggttaagtgcagtggaagctgtacactgcccaggcaagcgtcc gggcagcgtaggcggggcactcagatcccagccagtgacttagcccctgtttgctctc cgataactggggtgaccttggtaataattaccagcagcctccccggtgcccctctggatc cactgctaaatacggacgaggacagggccctgtctcctcagcttcaggcaccaccactg acctgggacagt</p>
<p>LMTP20 SEQ ID NO:133</p>	<p>aggctcagaggcacacaggagttctgggctcacctgccccctccaaccctcagttc ccatcctccagcagctgtttgtgtgctgcctctgaagtccacactgaacaaactcagccta ctcatgtccctaaaatgggcaaacattgcaagcagcaaacagcaaacacacagccctcc ctgcctgctgacctggagctggggcagaggtcagagacctctctgggccatgccacct ccaacatccactcgaccccttgaatttcggtggagaggagcagaggtgtcctggcgtg gtttaggtagtgtgagagggccctcagattaaaaataactgaggttaaggcctgggtag gggaggtggtgtgagacgctcctgtctcctctatctgccatcggccctttggggagga ggaatgtgccaaggactaaaaaaaggccatggagccagaggggcgagggcaacag accttcatgggcaaaccttggggccctgctgaagcttggccactacgggtttaggctg cccatgtaaggaggcaaggcctggggacaccgagatgcctggttataattaaccaga catgtggtgcccccccccccccaacctgctgcctctaaaaataacctgtccctggt ggatcccctgcatgcaagatcttgaacaaggctgtgggggactgaggcaggctgta acaggcttggggcccagggttatacgtgcctgggactccaaagtattactgttccatgt cccggcgaaggccagctgtccccgccagctagactcagcacttagtttaggaaccag tgagcaagtacagcccttggggcagcccatacaaggccatggggctgggcaagctgcac gcctgggtccgggtggggcacgggtgccgggcaacgagctgaaagctcatctgctctc aggggcccctccctggggacagcccctcctggctagtacaccctgtaggctcctctata</p>

	<p>taaccaggggcacaggggctgccctcattctaccaccactccacagcacagacagac actcaggagccagccagcgtcgagatcttgctaccagtggaacagccactaaggattctg cagtgagagcagagggccagctaagtgggtactctcccagagactgtctgactcacgcca ccccctccaccttgacacaggacgctgtggtttctgagccaggtacagtgactcctttcg gtaagtgcagtggaagctgtacactgccaggcaaagcgtccgggcagcgtaggcggg cgactcagatcccagccagtgacttagccccctgtttgctctccgataactggggtgacc ttggttaatattcaccagcagcctccccggtgccctctggatccactgcttaaacgga cgaggacagggccctgtctcctcagcttcaggcaccaccactgacctgggacagt</p>
<p>ApoE.hAAT SEQ ID NO:134</p>	<p>aggctcagaggcacacaggagtttctgggctcacctgcccccctccaaccctcagttc ccatcctccagcagctgtttgtgtgctgcctctgaagtccacactgaacaaactcagccta ctcatgtccctaaaatgggcaaacattgcaagcagcaaacagcaaacacacagccctcc ctgcctgtgaccttgagctggggcagaggtcagagacctctctgggccatgccacct ccaacatccactcgaccccttgaatttcggtggagaggagcagaggtgtctggcgtg gttaggtagtgtgagaggggtaccggggatcttgctaccagtggaacagccactaagg attctgcagtgagagcagagggccagctaagtgggtactctcccagagactgtctgactca cgccacccccctccaccttgacacaggacgctgtggtttctgagccaggtacaatgactc ctttcggtaaagtcagtggaagctgtacactgccaggcaaagcgtccgggcagcgtag gccccgactcagatcccagccagtgacttagccccctgtttgctctccgataactggg gtgaccttggttaatattcaccagcagcctccccggtgccctctggatccactgcttaaa acggacgaggacagggccctgtctcctcagcttcaggcaccaccactgacctgggaca gt</p>
<p>Энхансер альфа-Mic/Bik (Mic/BikE) SEQ ID NO:135</p>	<p>aggttaatttttaaaaagcagtcaaaagccaagtggcccttggcagcatttactctctggt tgctctggtaataatctcaggagcacaaacattcc</p>
<p>Тандемные энхансеры (2) альфа-Mic/Bik (2 Mic/BikE) SEQ ID NO:136</p>	<p>aggttaatttttaaaaagcagtcaaaagccaagtggcccttggcagcatttactctctggt tgctctggtaataatctcaggagcacaaacattccaggtaatttttaaaaagcagtcaaa gtccaagtggcccttggcagcatttactctctctgtttgctctggtaataatctcaggagcac aaacattcc</p>
<p>Печеночная контролирующая область ApoE, содержащая энхансер ApoE SEQ ID NO:137</p>	<p>aggctcagaggcacacaggagtttctgggctcacctgcccccctccaaccctcagttc ccatcctccagcagctgtttgtgtgctgcctctgaagtccacactgaacaaactcagccta ctcatgtccctaaaatgggcaaacattgcaagcagcaaacagcaaacacacagccctcc ctgcctgtgaccttgagctggggcagaggtcagagacctctctgggccatgccacct ccaacatccactcgaccccttgaatttcggtggagaggagcagaggtgtctggcgtg gttaggtagtgtgagaggg</p>

<p>Тандемные энхансеры APOE (2) SEQ ID NO:138</p>	<p>aggctcagaggcacacaggagttctgggctcacctgccccctccaaccctcagttc ccatcctccagcagctgtttgtgtgctgcctctgaagtccacactgaacaaactcagccta ctcatgtccctaaaatgggcaaacattgcaagcagcaaacagcaaacacacagccctcc ctgctgtgacctggagctggggcagaggtcagagacctctctgggccatgccacct ccaacatccactcgaccccttggaaattcggaggagaggagcagaggtgtcctggcgtg gtttaggtagtgtgagagggtctagaaggctcagaggcacacaggagttctgggctcac cctgccccctccaaccctcagttccatcctccagcagctgtttgtgtgctgcctctgaa gtccacactgaacaaactcagcctactcatgtccctaaaatgggcaaacattgcaagcag caaacagcaaacacacagccctccctgcctgctgacctggagctggggcagaggtca gagacctctctg</p>
<p>Промотор hAAT SEQ ID NO:139</p>	<p>gatcttgctaccagtggaacagccactaaggattctgcagtgagagcagagggccagct aagtggactctcccagagactgtctgactcacgccacccctccacctggacacagga cgctgtggtttctgagccaggtacaatgactccttcggtaagtgcagtggaagctgtacac tgcccaggcaaacgctccgggcagcgtaggcgggcgactcagatcccagccagtgga cttagcccctgtttgctcctccgataactggggtagccttggttaattaccagcagcctc ccccgttccccctctggatccactgcttaatacggacgaggacagggccctgtctcctca gcttcaggcaccaccactgacctgggacagt</p>
<p>Промотор hAAT(<u>ΔATG</u>) SEQ ID NO:140</p>	<p>gatcttgctaccagtggaacagccactaaggattctgcagtgagagcagagggccagct aagtggactctcccagagactgtctgactcacgccacccctccacctggacacagga cgctgtggtttctgagccaggtacagtgactccttcggtaagtgcagtggaagctgtaca ctgcccaggcaaacgctccgggcagcgtaggcgggcgactcagatcccagccagtgg acttagcccctgtttgctcctccgataactggggtagccttggttaattaccagcagcct ccccgttccccctctggatccactgcttaatacggacgaggacagggccctgtctcctc agcttcaggcaccaccactgacctgggacagt</p>
<p>Энхансер Mck (MckE) SEQ ID NO:141</p>	<p>ccactacgggttaggctgccatgtaaggaggcaaggcctggggacacccgagatgc ctggttataattaaccagacatgtggctgcccccccccccccaacacctgtgcctcta aaaataaccctgtccctggtggatc</p>
<p>Тандемные энхансеры Mck (2) (2 MckE) SEQ ID NO:142</p>	<p>ccactacgggttaggctgccatgtaaggaggcaaggcctggggacacccgagatgc ctggttataattaaccagacatgtggctgcccccccccccccaacacctgtgcctcta aaaataaccctgtccctggtggatccactacgggttaggctgccatgtaaggaggca aggcctggggacacccgagatgcctggttataattaaccagacatgtggctgcccccc cccccaacacctgtgcctctaaaataaccctgtccctggtggatc</p>
<p>Тандемные энхансеры Mck (3)</p>	<p>ccactacgggttaggctgccatgtaaggaggcaaggcctggggacacccgagatgc ctggttataattaaccagacatgtggctgcccccccccccccaacacctgtgcctcta</p>

(3 MckE) SEQ ID NO:143	aaaataaccctgtccctggatcccactacgggttaggctgccatgtaaggaggca aggcctggggacacccgagatgcctggttataattaaccagacatgtggctgcccccc cccccaacacctgctgcctctaaaaataaccctgtccctggatcccactacgggt taggctgccatgtaaggaggcaaggcctggggacacccgagatgcctggttataat cccagacatgtggctgcccccccccccccaacacctgctgcctctaaaaataaccctg ccctggatg
Энхансер тяжелой цепи миозина (MhcE) SEQ ID NO:144	ccctcagattaaaaataactgaggaaggcctggtagggagggtggtgtgagacgct cctgtctctctctatctgccatcgccctttggggaggaggaatgtccaaggactaa aaaaaggccatggagccagagggcgagggaacagaccttcatgggcaaaccttgg ggcctgctgaagcttggc

[0085] В определенных вариантах осуществления вирусные векторы, представленные в данном документе, содержат один или более регуляторных элементов, отличных от промотора. В определенных вариантах осуществления вирусные векторы, представленные в данном документе, содержат энхансер. В определенных вариантах осуществления вирусные векторы, представленные в данном документе, содержат репрессор. В определенных вариантах осуществления вирусные векторы, представленные в данном документе, содержат интрон (например, интрон VH4 (SEQ ID NO: 57) или химерный интрон (SEQ ID NO: 56). Вирусные векторы могут также включать последовательность Козак для стимуляции трансляции продукта трансгена, например, GCCACC.

[0086] В определенных вариантах осуществления вирусные векторы, представленные в данном документе, содержат последовательность полиаденилирования ниже кодирующей области трансгена. Любой поли(A)-сайт, который сигнализирует об окончании транскрипции и направляет синтез поли(A)-хвоста, подходит для использования в векторах AAV по настоящему изобретению. Иллюстративные поли(A)-сигналы получены из следующих, но не ограничиваются им: позднего гена SV40, гена β -глобина кролика (SEQ ID NO: 55), гена гормона роста крупного рогатого скота (BPH), гена гормона роста человека (hGH), синтетического поли(A)-сайта (SPA) и гена бычьего гормона роста (bGH). См., например, Powell and Rivera-Soto, 2015, *Discov. Med.*, 19(102):49-57.

[0087] Предложены кассеты генной экспрессии и rAAV, содержащие кассеты генной экспрессии, в которых экспрессия трансгена контролируется сконструированными регуляторными элементами нуклеиновой кислоты, которые имеют более одного регуляторного элемента (промотора или энхансера).

5.2.4 Сигнальные пептиды

[0088] В определенных вариантах осуществления векторы, представленные в данном документе, содержат компоненты, которые модулируют доставку белка. В определенных вариантах осуществления вирусные векторы, представленные в данном документе, содержат одну или более нуклеотидных последовательностей, кодирующих сигнальный пептид, которые слиты с нуклеотидной последовательностью, кодирующей Fc-слитый белок к TNF α , так что белок, экспрессируемый из трансгена, имеет сигнальную последовательность на N-конце для направления секреции. Сигнальные пептиды могут также называться в данном документе «лидерными последовательностями» или «лидерными пептидами». В определенных вариантах осуществления сигнальные пептиды позволяют продукту трансгена достичь желаемой упаковки (например, гликозилирования) в клетке. В определенных вариантах осуществления сигнальные пептиды позволяют продукту трансгена достичь желаемой локализации в клетке. В определенных вариантах осуществления сигнальные пептиды позволяют продукту трансгена достичь секреции из клетки.

[0089] Существует два общих подхода к выбору сигнальной последовательности для продукции белка в контексте генной терапии или в культуре клеток. Один из подходов заключается в использовании сигнального пептида из белков, гомологичных экспрессируемому белку. Например, сигнальный пептид человеческого антитела можно использовать для экспрессии IgG в СНО или других клетках. Еще один подход заключается в идентификации сигнальных пептидов, оптимизированных для конкретных клеток-хозяев, используемых для экспрессии. Сигнальные пептиды можно обменивать между разными белками или даже между белками разных организмов, но, как правило, для экспрессии белка используются сигнальные последовательности наиболее широко секретлируемых белков этого типа клеток. Например, было обнаружено, что сигнальный пептид человеческого альбумина, белка, наиболее распространенного в плазме, существенно увеличивает выход белка в клетках СНО. Однако определенные сигнальные пептиды могут сохранять функцию и проявлять активность после отщепления от экспрессируемого белка в качестве «функций после нацеливания». Таким образом, в конкретных вариантах осуществления сигнальный пептид выбран из сигнальных пептидов наиболее распространенных белков, секретлируемых клетками, используемыми для экспрессии, чтобы избежать выполнения функций после нацеливания. В определенном варианте осуществления сигнальная последовательность слита с последовательностями как тяжелой, так и легкой цепи. Иллюстративной последовательностью является MYRMQLLLLI~~AL~~SLALVTNS (SEQ ID NO: 62), которая может кодироваться нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 63 (см. таблицу 2, Фиг. 2А и В). Альтернативно, сигнальные последовательности, которые

подходят для экспрессии и могут вызывать селективную экспрессию или направленную экспрессию чПМ Fc-слитого белка к TNF α в глазу (тканях глаза), представлены в таблице 2 ниже. Также представлены сигнальные последовательности, активные в клетках печени (таблица 3) и мышцах (таблица 4).

Таблица 2. Сигнальные пептиды для экспрессии в ткани глаза

Источник сигнального пептида	SEQ ID NO:	Последовательность
Мутантный сигнальный пептид интерлейкина 2	62	MYRMQLLLLIALLSLALVTNS
Последовательность, кодирующая мутантный сигнальный пептид интерлейкина-2	63	atgtataggatgcaactgctcctctgattgctctgagcctggctcttgaccactct
Сигнальный пептид VEGF-A	64	MNFLLSWVHWSLALLLYLHNAKWSQA
Сигнальный пептид фибулина-1	65	MERAAPSRRVPLPLLLLGGGLALLAAGVDA
Сигнальный пептид витронектина	66	MAPLRPLLILALLAWVALA
Сигнальный пептид фактора комплемента Н	67	MRLLAКIIСLMLWAICVA
Сигнальный пептид оптицина	68	MRLLAFLSLLALVLQETGT
Сигнальный пептид альбумина	69	MKWVTFISLLFLFSSAYS
Сигнальный пептид химотрипсिनогена	70	MAFLWLLSCWALLGTTFG
Сигнальный пептид интерлейкина-2	71	MYRMQLLSCIALILALVTNS

Источник сигнального пептида	SEQ ID NO:	Последовательность
Мутантный сигнальный пептид интерлейкина 2	62	MYRMQLLLLIALLSLALVTNS
Последовательность, кодирующая мутантный сигнальный пептид интерлейкина-2	63	atgtataggatgcaactgctcctctgattgctctgagcctggctcttgaccaactct
Сигнальный пептид трипсиногена-2	72	MNLLLILTFVAAAVA

Таблица 3. Сигнальные пептиды для экспрессии в клетках печени.

Источник сигнального пептида	SEQ ID NO:	Последовательность
Альбумин сыворотки человека	73	MKWVTFISLLFLFSSAYS
Человеческий α -1- антитрипсин (SERPINA1)	74	MPSSVSWGILLLAGLCCLVPVSLA
Человеческий аполипопротеин А-1	75	MKAAVLTAVLFLTGSQA
Человеческий аполипопротеин А-2	76	MKLLAATVLLLTICSLEG
Человеческий аполипопротеин В- 100	77	MDPPRPALLALLALPALLLLLLLAGARA
Фактор свертывания крови IX человека	78	MQRVNMIMAESPGLITICLLGYLLSAEC

Источник сигнального пептида	SEQ ID NO:	Последовательность
Человеческий компонент комплемента C2	79	MGPLMVLFCLLFLYPGLADS
Человеческий белок 2, связанный с фактором комплемента H, (CFHR2)	80	MWLLVSVILISRISSVGG
Человеческий белок 5, связанный с фактором комплемента H, (CFHR5)	81	MLLLFSVILISWVSTVGG
Альфа-цепь человеческого фибриногена (FGA)	82	MFSMRIVCLVLSVVGTAWT
Бета-цепь человеческого фибриногена (FGB)	83	MKRMVSWSFHKLKTMKHLLLLLLCVFLVKS
Гамма-цепь человеческого фибриногена (FGG)	84	MSWSLHPRNLILYFYALLFLSSTCVA
Человеческий α -2- HS-гликопротеин (AHSG)	85	MKSLVLLLCLAQLWGCHS
Гемопексин человека (HPX)	86	MARVLGAPVALGLWSLCWSLAIA
Кининоген-1 человека	87	MKLITILFLCSRLLLSLT
Человеческий связывающий	88	MSLFPSLPLLLLSMVAASYS

Источник сигнального пептида	SEQ ID NO:	Последовательность
маннозу белок С (MBL2)		
Плазминоген человека (PLMN)	89	MEHKEVVLLLLLFLKSGQG
Протромбин человека (фактор свертывания крови II)	90	MAHVRGLQLPGCLALAALCSLVHS
Секретируемый фосфопротеин 24 человека	91	MISRMEKMTMMMKILIMFALGMNYWSCSG
Человеческий антитромбин-III (SERPINC1)	92	MYSNVIGTVTSGKRKVYLLSLLLIGFWDCVTC
Серотрансферрин человека (TF)	93	MRLAVGALLVCAVLGLCLA

Таблица 4. Сигнальные пептиды для экспрессии в мышечных клетках.

Источник сигнального пептида	SEQ ID NO:	Последовательность
SPARC человека	94	MRAWIFFLLCLAGRALA
Цепь человеческого коллагена альфа-1 (I)	95	MFSFVDLRLLLLLLAATALLTHG
Человеческий лактотрансферрин	96	MKLVFLVLLFLGALGLCLA
Человеческий компонент комплемента C3	97	MGPTSGPSLLLLLLTHLPLALG
Человеческий люмикан	98	MSLSAFTLFLALIGGTSG
Изоформа 1 гельзолина человека	99	MAPHRPAPALLCALSLALCALSLPVRA
Прокатепсин Н человека	100	MWATLPLLCAGAWLLGVPVCGA

Источник сигнального пептида	SEQ ID NO:	Последовательность
SERPINF1 человека	101	MQALVLLLCIGALLGHSSC
SERPINE1 человека	102	MQMSPALTCLVLGLALVFGECSA
Катепсин D человека	103	MQPSSLLPLALCLLAAPASA
TIMP1 человека	104	MAPFEPLASGILLLLWLIAPSRA
Фибронектин человека	105	MLRGP GPGLLLLAVQCLGTAVPSTGASKSKR
Субкомпонент человеческого компонента комплемента C1s	106	MWCIVLFSLLAWVYA
Катепсин L1 человека	107	MNPTLILAAFCLGIASA
Катепсин B человека	108	MWQLWASLCCLLVLANA
Кислый богатый пролином фосфопротеин слюны человека ½	109	MLLILLSVALLAFSSA
Человеческий родственный фоллистатину белок 1	110	MWKRWLALALALVAVAVVRA

5.2.5 Нетранслируемые области

[0090] В определенных вариантах осуществления вирусные векторы, представленные в данном документе, содержат одну или более нетранслируемых областей (UTR), например, 3'- и/или 5'-UTR. В определенных вариантах осуществления UTR оптимизированы в отношении желаемого уровня экспрессии белка. В определенных вариантах осуществления UTR оптимизированы в отношении периода полужизни мРНК трансгена. В определенных вариантах осуществления UTR оптимизированы в отношении стабильности мРНК трансгена. В определенных вариантах осуществления UTR оптимизированы в отношении вторичной структуры мРНК трансгена.

5.2.6 Инвертированные концевые повторы

[0091] В определенных вариантах осуществления вирусные векторы, представленные в данном документе, содержат одну или более последовательностей инвертированных концевых повторов (ITR). Последовательности ITR можно использовать для упаковки кассеты экспрессии рекомбинантного гена в вирион вирусного вектора. В

определенных вариантах осуществления ITR происходит от AAV, например, AAV8 или AAV2 (см., например, Yan et al., 2005, J. Virol., 79(1):364-379; патент США № 7282199 B2, патент США № 7790449 B2, патент США № 8318480 B2, патент США № 8962332 B2 и международную заявку на патент № PCT/EP2014/076466, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки). В предпочтительных вариантах осуществления нуклеотидные последовательности, кодирующие ITR, могут, например, содержать нуклеотидные последовательности SEQ ID NO: 58 (5'-ITR) или 60 (3'-ITR). В некоторых вариантах осуществления могут использоваться модифицированные ITR, используемые для получения самокомплементарного вектора, например, scAAV (см., например, Wu, 2007, Human Gene Therapy, 18 (2): 171-82, McCarty et al, 2001, Gene Therapy, Vol 8, Number 16, страницы 1248-1254; и патенты США №№ 6596535, 7125717 и 7456683, каждый из которых полностью включен в данный документ посредством ссылки). В предпочтительных вариантах осуществления нуклеотидные последовательности, кодирующие модифицированные ITR, могут, например, включать нуклеотидные последовательности SEQ ID NO:58 (5'-ITR) или 60 (3'-ITR) или модифицированные для scAAV, SEQ ID NO:59 (m 5'ITR) или SEQ ID NO: 61 (m 3'ITR).

5.2.7 Трансгены

[0092] Трансгены кодируют чПМ Fc-слитый белок к TNF α , например, слитый белок TNFR1:Fc или слитый белок TNFR2:Fc, основанный на раскрытом в данном документе терапевтическом Fc-слитом белке к TNF α . В конкретных вариантах осуществления чПМ Fc-слитый белок к TNF α сконструирован так, чтобы он содержал дополнительные сайты гликозилирования в домене TNFR и/или Fc. Кроме того, домен Fc из Fc-слитого белка к TNF α может быть сконструирован для изменения сайта гликозилирования в N297 для предотвращения гликозилирования в этом сайте (например, замена в N297 другой аминокислотой и/или замена в T297 для остатка, который не является T или S, чтобы инактивировать сайт гликозилирования). Такие домены Fc являются «агликозилированными».

5.2.7.1 Конструкции для экспрессии чПМ слитых белков TNFR:Fc

[0093] В определенных вариантах осуществления трансген кодирует слитый белок к TNF α , где Fc-слитый белок к TNF α содержит растворимую внеклеточную часть рецептора TNF α человека типа I (TNFR1) или типа II (TNFR2), ковалентно связанную, например, посредством пептидной связи к полипептиду, содержащему домен Fc тяжелой цепи иммуноглобулина.

[0094] В определенных вариантах осуществления трансген кодирует весь или TNF α -связывающую часть внеклеточного домена TNFR2 (SEQ ID NO: 2), слитого со всем или

частью домена Fc (включая, например, шарнир, домены CH2 и CH3) тяжелой цепи иммуноглобулина (SEQ ID NO: 3 или 4). В предпочтительных вариантах осуществления трансген кодирует Fc-слитый белок к TNF α , где Fc-слитый белок к TNF α содержит растворимый внеклеточный домен TNFR2 человека, ковалентно связанный, например, посредством пептидной связи, с доменом Fc IgG1 человека (включая CH2 тяжелой цепи и CH3 тяжелой цепи и шарнирную область), которые при экспрессии связываются с образованием димерного слитого белка TNFR2:Fc. В частности, Fc-слитый белок к TNF α представляет собой этанерцепт (имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10 или 11 с лидирующей последовательностью) или любой биоаналог этанерцепта, включая этанерцепт-szsz (ERELZI®) и этанерцепт-ухро (ETICOVO®).

[0095] В других вариантах осуществления трансген кодирует весь или часть растворимого внеклеточного домена TNFR1 (SEQ ID NO: 1), слитого со всем или частью домена Fc тяжелой цепи иммуноглобулина (SEQ ID NO: 6 или 7). В предпочтительных вариантах осуществления трансген кодирует Fc-слитый белок к TNF α , где Fc-слитый белок к TNF α содержит растворимый внеклеточный домен TNFR1 человека, ковалентно связанный, например, посредством пептидной связи, с частью Fc IgG1 человека (включая CH2 тяжелой цепи и CH3 тяжелой цепи и шарнирную область), которые при экспрессии связываются с образованием димерного слитого белка TNFR1:Fc (SEQ ID NO: 12). В некоторых вариантах осуществления TNFR1 слит с доменом Fc через сайт расщепления тромбином LVPRGS (SEQ ID NO:8). В некоторых вариантах осуществления Fc-слитый белок к TNF α представляет собой EYS060 (имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12).

[0096] Рекомбинантные конструкции AAV экспрессируют чПМ Fc-слитый белок к TNF α в клетке, клеточной культуре или у субъекта. Нуклеотидные последовательности, кодирующие растворимый внеклеточный домен TNFR и домены Fc, могут быть кодон-оптимизированы для экспрессии в клетках человека и иметь уменьшенное количество CpG-димеров в последовательности для стимуляции экспрессии в клетках человека. В предпочтительных вариантах осуществления трансгены кодируют любой из описанных в данном документе терапевтических Fc-слитых белков к TNF α , например, слитый TNFR:Fc, изображенный на Фиг. 1 или 2 (последовательности представлены на Фиг. 2A и 2B).

[0097] В определенных вариантах осуществления домен Fc представляет собой домен Fc IgG, но в других вариантах осуществления область Fc может представлять собой IgA, IgD, IgE или IgM. Fc-слитый белок, экспрессируемый из трансгена, может иметь домен Fc IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, но предпочтительно получен из IgG1 человека. Домен Fc

может включать некоторые или все домены CH1, шарнир, CH2 и CH3 тяжелой цепи, описанные в данном документе (см. Фиг. 4 и таблицу 5), или их фрагменты или варианты.

[0098] Домен Fc Fc-слитого белка имеет одну или более эффекторных функций, которые варьируются в зависимости от изотипа антитела. Эффекторные функции могут быть такими же, как у антитела дикого типа или терапевтического Fc-слитого белка, или могут быть модифицированы на их основе для добавления, усиления, модификации или ингибирования одной или более эффекторных функций с использованием модификаций Fc, описанных в разделе 5.2.8 ниже. В определенных вариантах осуществления трансген чПМ немоноклонального антитела кодирует слитый белок, содержащий полипептид Fc, содержащий аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92 %, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с последовательностью, указанной в полипептидах домена Fc терапевтического слитого белка, описанного в данном документе, как указано в таблице 6 для этанерцепта или иллюстративном домене Fc изотипа IgG1, IgG2 или IgG4, как указано в таблице 5. В некоторых вариантах осуществления чПМ слитый белок содержит полипептид Fc или последовательность, которая является вариантом последовательности полипептида Fc в таблице 5, в которой последовательность была модифицирована с помощью одного или более способов, описанных в разделе 5.2.8 ниже, для изменения эффекторной функции полипептида Fc.

[0099] Рекомбинантные конструкции AAV экспрессируют чПМ Fc-слитый белок к TNF α в клетке, клеточной культуре или у субъекта. Нуклеотидные последовательности, кодирующие Fc-слитый белок к TNF α , могут быть кодон-оптимизированы для экспрессии в клетках человека и иметь уменьшенное количество CpG-димеров в последовательности для стимуляции экспрессии в клетках человека. В предпочтительных вариантах осуществления трансген кодирует любой терапевтический Fc-слитый белок к TNF α , описанный в данном документе, например, терапевтический Fc-слитый белок к TNF α этанерцепт или EYS606, изображенный на **Фиг. 2A и 2B** в данном документе и включая, в некоторых вариантах осуществления, связанный домен Fc, представленный в таблице 6 или, альтернативно, в таблице 5. Домен Fc дополнительно обсуждается в разделе 5.2.8. Примеры последовательностей доменов Fc представлены в таблице 6, а также на Фиг. 3 и в таблице 5. На Фиг. 2A представлена аминокислотная последовательность слитого белка TNFR2:Fc этанерцепта, а на Фиг. 2B представлена аминокислотная последовательность слитого белка TNFR1:Fc EYS606 (см. также таблицу 6).

[0100] В некоторых вариантах осуществления трансген для экспрессии Fc-слитого белка к TNF α может содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую

растворимую внеклеточную часть рецептора TNF α человека типа I (TNFR1) или типа II (TNFR2), ковалентно связанную, например, через пептидную связь с полипептидом, содержащим домен Fc тяжелой цепи иммуноглобулина, как описано далее в данном документе. В некоторых вариантах осуществления TNFR1 слит с доменом Fc через сайт расщепления тромбином (SEQ ID NO:8).

[0101] Нуклеотидные последовательности, кодирующие растворимый внеклеточный домен TNFR1 или TNFR2, необязательно сайт расщепления тромбином, шарнирную область и цепь Fc IgG1 (CH2 + CH3) терапевтического Fc-слитого белка к TNF α , как описано в данном документе, представлены в таблице 7. В некоторых вариантах осуществления эти нуклеотидные последовательности являются кодон-оптимизированными для экспрессии в клетках человека. См., например, кодон-оптимизированные последовательности этанерцепта (SEQ ID NO: 15-18) в таблице 7.

[0102] Трансген может включать часть шарнирной области, которая образует межцепочечные дисульфидные связи (например, часть, содержащую последовательность CPPCPA (SEQ ID NO:153). Последовательности доменов Fc, которые не содержат части шарнирной области, содержащей последовательность CCPCPA (SEQ ID NO:153), не будут образовывать дисульфидные связи внутри цепи, тогда как последовательности слитых доменов Fc с частью шарнирной области на С-конце, содержащей последовательность CPPCPA (SEQ ID NO:153) будет образовывать внутрицепочечные дисульфидные связи и, таким образом, будет образовывать фрагменты димерных слитых белков. В некоторых вариантах осуществления шарнир содержит всю аминокислотную последовательность или ее часть EPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGG (SEQ ID NO:145), и, в частности, EPKSCDKTHL (SEQ ID NO:146), EPKSCDKTHT (SEQ ID NO:147), EPKSCDKTHTCPPCPA (SEQ ID NO:148), EPKSCDKTHLCPPCPA (SEQ ID NO:149), DKTHTCPPCPAPPELLGG (SEQ ID NO:21), DKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFL (SEQ ID NO:152), EPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFL (SEQ ID NO:150) или EPKSCDKTHLCPPCPAPELLGGPSVFL (SEQ ID NO:151).

[0103] В некоторых вариантах осуществления вирусные векторы, предложенные в данном документе, содержат следующие элементы в следующем порядке: а) конститутивная или индуцируемая (например, индуцируемая гипоксией или индуцируемая рифамицином) промоторная последовательность или тканеспецифическая промоторная/регуляторная область, например, одна из регуляторных областей, представленных в таблице 1 или таблице 1a, в частности промотор, который способствует экспрессии, специфичной для ткани глаза, и б) последовательность, кодирующую трансген (например, Fc-слитый белок к TNF α). В определенных вариантах осуществления

последовательность, содержащая трансген, кодирует Fc-слитый белок к TNF α , содержащий растворимую внеклеточную часть рецептора TNF α человека типа I (TNFR1) или типа II (TNFR2), ковалентно связанную, например, посредством пептидной связи, с полипептидом, содержащим доменом Fc тяжелой цепи иммуноглобулина. В определенных вариантах осуществления последовательность, содержащая трансген, кодирует сигнальную последовательность на N-конце Fc-слитого белка к TNF α , которая направляет секрецию и посттрансляционную модификацию в указанных клетках глаза человека. В других вариантах осуществления последовательность кодирует продукт трансгена, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, 11 или 12. В предпочтительных вариантах осуществления слитый белок к TNF α представляет собой этанерцепт или EYS606.

[0104] В определенных вариантах осуществления вирусные векторы, предложенные в данном документе, содержат следующие элементы в следующем порядке: а) конститутивную или индуцируемую промоторную последовательность или тканеспецифический промотор, такой как один из промоторов или регуляторных областей в таблицах 1 и 1a, и б) последовательность, кодирующую трансген (например, Fc-слитый белок к TNF α), где трансген содержит сигнальный пептид, растворимую внеклеточную часть рецептора TNF α человека типа I (TNFR1) или типа II (TNFR2), ковалентно связанную, например, через пептидную связь с полипептидом, содержащим доменом Fc тяжелой цепи иммуноглобулина, с образованием Fc-слитого белка к TNF α . В других вариантах осуществления вирусные векторы, представленные в данном документе, содержат следующие элементы в следующем порядке: а) промотор, специфичный для ткани глаза, перечисленный в таблицах 1 и 1a, и б) последовательность, кодирующая трансген, содержащий сигнальный пептид, при этом трансген содержит сигнальный пептид, растворимую внеклеточную часть рецептора TNF α человека типа I (TNFR1) или типа II (TNFR2), ковалентно связанную, например, посредством пептидной связи, с полипептидом, содержащим доменом Fc тяжелой цепи иммуноглобулина, с образованием Fc-слитого белка к TNF α . В конкретных вариантах осуществления вирусные векторы, представленные в данном документе, дополнительно содержат сайт расщепления тромбином, связанный с C-концом домена TNFR, имеющего аминокислотную последовательность LSPRGS (SEQ ID NO:158).

[0105] В конкретных вариантах осуществления предложены векторы AAV, содержащие вирусный капсид, который имеет по меньшей мере 95% идентичности с аминокислотной последовательностью капсида AAV2.7m8, капсида AAV8, капсида AAV3B или капсида AAVrh73 (см. Фиг. 3); и искусственный геном, содержащий кассету экспрессии,

фланкированную инвертированными концевыми повторами (ITR) AAV, где кассета экспрессии содержит трансген, кодирующий Fc-слитый белок к TNF α ; функционально связанный с одной или более регуляторными последовательностями, которые регулируют экспрессию трансгена в одной или более тканях глаза.

[0106] Векторы gAAV, которые кодируют и экспрессируют терапевтический слитый белок, можно вводить для лечения, предотвращения или облегчения симптомов заболевания или патологического состояния, которые поддаются лечению, предотвращению или облегчению симптомов с помощью терапевтического слитого белка. Также предложены способы экспрессии чПМ Fc-слитого белка к TNF α в клетках человека с использованием векторов gAAV и кодирующих их конструкций.

5.2.8 Модификации области Fc

[0107] В определенных вариантах осуществления трансгены кодируют Fc-слитые белки к TNF α , которые связываются с образованием димерного Fc-слитого белка. Соответственно, трансгены содержат нуклеотидные последовательности, кодирующие, например, растворимую внеклеточную часть рецептора TNF α человека типа I (TNFR1) или типа II (TNFR2), ковалентно связанную, например, посредством пептидной связи, с полипептидом, содержащим домен Fc тяжелой цепи иммуноглобулина (Фиг. 2A и 2B), включая всю или часть шарнирной области тяжелой цепи и N-конца пептида домена Fc. В таблице 6 представлены аминокислотные последовательности полипептидов Fc для некоторых терапевтических Fc-слитых белков к TNF α , описанных в данном документе. Альтернативно, домен Fc IgG2 или IgG4, последовательности которого представлены на Фиг. 4 и приведенные в таблице 5. Как подробно описано, трансген может содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид домена Fc для терапевтического Fc-слитого белка к TNF α , связанную с нуклеотидной последовательностью, кодирующей растворимую внеклеточную часть TNFR человека на N-конце шарнирной области, как предусмотрено в данном документе (с аминокислотными последовательностями, представленными на Фиг. 2A и 2B и в таблице 6).

[0108] Термин «область Fc» относится к димеру двух «полипептидов Fc» (или «доменов Fc»), при этом каждый из «полипептид Fc» включает константную область тяжелой цепи антитела, за исключением первого константного домена иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления «область Fc» включает два полипептида Fc, связанных одной или более дисульфидными связями, химическими линкерами или пептидными линкерами. «Полипептид Fc» относится к двум последним доменам константной области иммуноглобулина IgA, IgD и IgG и к трем последним доменам константной области иммуноглобулина IgE и IgM, а также к гибкому шарнирному N-концу этих доменов. Для

IgG, например, «полипептид Fc» включает иммуноглобулиновые домены Сгамма2 (C γ 2, часто называемый доменом CH2) и Сгамма3 (C γ 3, также называемый доменом CH3) и может включать нижнюю часть шарнирного домена между Сгамма1 (C γ 1, также называемый доменом CH1) и доменом CH2. Хотя границы полипептида Fc могут варьироваться, полипептид Fc тяжелой цепи IgG человека по определению, как правило, содержит остатки, начиная с T223 или C226, или P230 до ее карбоксильного конца, причем нумерация соответствует индексу EU, как у Kabat et al., (1991, NIH Publication 91-3242, National Technical Information Services, Springfield, Va.). Например, для IgA полипептид Fc содержит иммуноглобулиновые домены Сальфа2 (C α 2) и Сальфа3 (C α 3) и может включать нижнюю часть шарнирной области между Сальфа1 (C α 1) и C α 2.

[0109] В определенных вариантах осуществления полипептид Fc представляет собой полипептид этанерцепта или EYS606 (см. таблицу 6). В других вариантах осуществления полипептид Fc представляет собой полипептид Fc IgG. Полипептид Fc может происходить из изоформа IgG1, IgG2 или IgG4 (см. Фиг. 4 в отношении выравнивания последовательностей доменов Fc IgG1, IgG2 и IgG4, пронумерованных в соответствии с нумерацией EU) или может быть доменом Fc IgG3, в зависимости, например, от желаемой эффекторной активности терапевтического антитела. В некоторых вариантах осуществления сконструированная константная область тяжелой цепи (CH), которая включает домен Fc, является химерной. По существу, химерная область CH объединяет домены CH, происходящие от более чем одного изоформа и/или подтипа иммуноглобулина. Например, химерная (или гибридная) область CH включает часть или всю область Fc из IgG, IgA и/или IgM. В других примерах химерная область CH содержит часть или весь домен CH2, полученный из молекулы человеческого IgG1, человеческого IgG2 или человеческого IgG4, в комбинации с частью или всем доменом CH3, полученным из молекулы человеческого IgG1, человеческого IgG2 или человеческого IgG4. В других вариантах осуществления химерную область CH содержит химерную шарнирную область.

Таблица 5. Таблица аминокислотных последовательностей домена Fc

Домены Fc	Цепь/ SEQ ID NO:	Последовательность
IgG1	47	EPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Домены Fc	Цепь/ SEQ ID NO:	Последовательность
IgG2	48	<i>ERKCCVECPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQ FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPAIEKTIKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDISVE WESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVMEAL HNHYTQKSLSLSPGK</i>
IgG4	49	<i>ESKYGPPCSPCAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEV QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN NKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSVMSVMEALHNHYTQKS LSLSLGK</i>

[0110] В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные векторы кодируют терапевтические Fc-слитые белки, содержащие сконструированные (мутантные) области Fc, например сконструированные области Fc константной области IgG. Модификации константной области антитела, области Fc или фрагмента Fc антитела IgG могут изменять одну или более эффекторных функций, таких как связывание Fc-рецептора или связывание неонатального Fc-рецептора (FcRn) и, таким образом, период полужизни, активность КЗЦ, активность АЗКЦ и/или активность АЗКФ по сравнению с соответствующим антителом, имеющим константную область IgG дикого типа или константную область тяжелой цепи IgG без указанной модификации(-й). Соответственно, в некоторых вариантах осуществления антитело может быть сконструировано для обеспечения константной области антитела, области Fc или фрагмента Fc антитела IgG, которое демонстрирует измененное связывание (по сравнению с эталонной константной областью или константной областью дикого типа без указанной модификации(-й)) с одним или более Fc-рецепторами (например, рецептором FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIV или FcRn). В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой константную область антитела, область Fc или фрагмент Fc антитела IgG, которое проявляет одну или более измененных эффекторных функций, таких как активность КЗЦ, АЗКЦ или АЗКФ, по сравнению с соответствующим антителом, имеющим константную область IgG дикого типа или константную область IgG без указанной модификации(-й).

[0111] «Эффекторная функция» относится к биохимическому событию, которое является результатом взаимодействия области Fc антитела с Fc-рецептором или лигандом. Эффекторные функции включают опосредованные FcγR эффекторные функции, такие как АЗКЦ и АЗКФ, и опосредованные комплементом эффекторные функции, такие как КЗЦ.

[0112] «Эффекторная клетка» относится к клетке иммунной системы, которая экспрессирует один или более Fc-рецепторов и опосредует одну или более эффекторных функций. Эффекторные клетки включают, но не ограничиваются ими, моноциты, макрофаги, нейтрофилы, дендритные клетки, эозинофилы, тучные клетки, тромбоциты, В-клетки, большие гранулярные лимфоциты, клетки Лангерганса, натуральные клетки-киллеры (NK) и Т-клетки, и могут быть получены из любого организма, включая, помимо прочего, людей, мышей, крыс, кроликов и обезьян.

[0113] «АЗКЦ» или «антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность» относится к клеточно-опосредованной реакции, при которой неспецифические цитотоксические эффекторные (иммунные) клетки, экспрессирующие FcγR, распознают связанное антитело на клетке-мишени и впоследствии вызывают лизис клетки-мишени.

[0114] «АЗКФ» или «антителозависимый клеточно-опосредованный фагоцитоз» относится к клеточно-опосредованной реакции, при которой неспецифические цитотоксические эффекторные (иммунные) клетки, экспрессирующие FcγR, распознают связанное антитело на клетке-мишени и впоследствии вызывают фагоцитоз клетки-мишени.

[0115] «КЗЦ» или «комплемент-зависимая цитотоксичность» относится к реакции, в которой один или более компонентов белка комплемента распознают связанное антитело на клетке-мишени и впоследствии вызывают лизис этой клетки-мишени.

[0116] В некоторых вариантах осуществления модификации домена Fc включают, но не ограничиваются ими, следующие модификации и их комбинации со ссылкой на нумерацию EU константной области IgG (см. Фиг. 4): 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 248, 249, 250, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 301, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 312, 315, 318, 320, 322, 324, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 337, 338, 339, 340, 342, 344, 356, 358, 359, 360, 361, 362, 373, 375, 376, 378, 380, 382, 383, 384, 386, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 428, 430, 433, 434, 435, 437, 438, и 439.

[0117] В определенных вариантах осуществления область Fc включает добавление, делецию или замену аминокислот одного или более аминокислотных остатков 251-256, 285-290, 308-314, 385-389 и 428-436 IgG. В некоторых вариантах осуществления 251-256, 285-290, 308-314, 385-389 и 428-436 (нумерация EU по Kabat; см. Фиг. 4) заменены гистидином, аргинином, лизином, аспарагиновой кислотой, глутаминовой кислотой, серином, треонином, аспарагином или глутамином. В некоторых вариантах осуществления отличный

от гистидина остаток заменен гистидиновым остатком. В некоторых вариантах осуществления гистидиновый остаток заменен отличным от гистидина остатком.

[0118] Усиление связывания FcRn с помощью антитела, имеющего сконструированный Fc, приводит к предпочтительному связыванию антитела с усиленной аффинностью с FcRn по сравнению с антителом, имеющим Fc, дикого типа, и, таким образом, приводит к общему усиленному рециклингу антитела с усиленной аффинностью в отношении рецепторов FcRn, что приводит к дальнейшему увеличению периода полужизни антител. Усовершенствованный подход к рециркуляции обеспечивает высокоэффективное нацеливание и удаление антигенов, в том числе, например, антигены с «высоким титром» в кровотоке, такие как C5, цитокины или бактериальные или вирусные антигены.

[0119] В определенных вариантах осуществления представлены модифицированная константная область, область Fc или фрагмент Fc антитела IgG с усиленным связыванием с FcRn в сыворотке по сравнению с областью Fc дикого типа (без сконструированных модификаций). В некоторых случаях антитела, например, антитела IgG сконструированы для связывания с FcRn при нейтральном pH, например, при pH 7,4 или выше, для усиления зависимости от pH связывания с FcRn по сравнению с областью Fc дикого типа (без сконструированных модификаций). В некоторых случаях антитела, например, антитела IgG сконструированы так, чтобы проявлять повышенное связывание (например, повышенную аффинность или K_D) с FcRn в эндосомах (например, при кислом pH, например, при pH 6,0 или ниже) по сравнению с IgG дикого типа и/или эталонным антителом, связывающимся с FcRn при кислом pH, а также по сравнению со связыванием с FcRn в сыворотке (например, при нейтральном pH, например, при pH 7,4 или выше). Представлены антитела с константной областью сконструированного антитела, областью Fc или фрагментом Fc антитела IgG, которые демонстрируют улучшенный период полужизни в сыворотке или ткани резидентных клеток по сравнению с соответствующим антителом, имеющим константную область IgG дикого типа или константой IgG без указанной модификации(-й);

[0120] Неограничивающие примеры таких модификаций Fc включают, например, модификацию в положении 250 (например, E или Q); 250 и 428 (например, L или F); 252 (например, LN/Y/W или T), 254 (например, S или T) и 256 (например, S/R/Q/E/D или T); или модификацию в положении 428 и/или 433 (например, H/L/R/S/P/Q или K) и/или 434 (например, H/F или Y); или модификацию в положении 250 и/или 428; или модификацию в положении 307 или 308 (например, 308F, V308F) и 434. В одном варианте осуществления модификация включает модификацию 428L (например, M428L) и 434S (например, N434S); модификации 428L, 2591 (например, V2591) и 308F (например, V308F); модификации 433K

(например, H433K) и 434 (например, 434Y); модификации 252, 254 и 256 (например, 252Y, 254T и 256E); модификации 250Q и 428L (например, T250Q и M428L); и модификации 307 и/или 308 (например, 308F или 308P) (нумерация EU; см. Фиг. 4).

[0121] В некоторых вариантах осуществления область Fc может быть мутантной формой, такой как hIgG1 Fc, включая мутации M252, например M252Y, S254T и T256E («мутация YTE») проявляют повышенную аффинность к человеческому FcRn (Dall'Acqua, et al., 2002, *J Immunol* 169: 5171-5180) и последующую кристаллическую структуру этого мутантного антитела, связанного с hFcRn, что приводит к созданию двух соляных мостиков (Oganessian, et al. 2014, *JBC* 289(11): 7812–7824). Антитела, содержащие мутацию YTE, вводили обезьянам и людям, и у них значительно улучшились фармакокинетические свойства (Haraya, et al., 2019, *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 34(1):25-41).

[0122] В некоторых вариантах осуществления модификации одного или более аминокислотных остатков в области Fc могут снижать период полужизни в системном кровотоке (сыворотке), однако приводят к улучшенному удержанию в тканях (например, в глазу) за счет блокирования связывания FcRn (например, H435A, нумерация EU по Kabat) (Ding et al., 2017, *MAbs* 9:269-284; и Kim, 1999, *Eur J Immunol* 29:2819).

[0123] В некоторых вариантах осуществления домен Fc может быть сконструирован для активации всех, некоторых или ни одной из нормальных эффекторных функций Fc, не влияя на желаемые фармакокинетические свойства полипептида Fc (например, антитела). Полипептиды Fc с измененной эффекторной функцией могут быть желательными, поскольку они могут снижать нежелательные побочные эффекты, такие как активация эффекторных клеток терапевтическим белком.

[0124] Способы изменения или даже устранения эффекторной функции могут включать мутацию(-и) или модификацию(-и) аминокислотных остатков шарнирной области антитела. Например, мутанты домена Fc IgG, содержащие замены 234A, 237A и 238S, в соответствии с системой нумерации EU, демонстрируют сниженный комплемент-зависимый лизис и/или опосредованное клетками разрушение. Делеции и/или замены в нижнем шарнире, например, где положения 233-236 в пределах шарнирного домена (нумерация EU) удалены или изменены на глицин, как было показано в данной области, значительно снижают активность АЗКЦ и КЗЦ.

[0125] В конкретных вариантах осуществления домен Fc представляет собой агликозилированный домен Fc, который имеет замену в остатке 297 или 299 для изменения сайта гликозилирования на 297, так что домен Fc не гликозилирован. Такие агликозилированные домены Fc могут обладать пониженной АЗКЦ или другой эффекторной активностью.

[0126] Неограничивающие примеры белков, содержащих мутантные и/или химерные области СН с измененными эффекторными функциями, и способы конструирования и тестирования мутантных антител описаны в данной области техники, например, в K.L. Amour, et al., Eur. J. Immunol. 1999, 29:2613–2624; Lazar et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2006, 103:4005; публикации заявки на патент США № 20070135620A1, опубликованной 14 июня 2007 г.; публикации заявки на патент США № 20080154025 A1, опубликованной 26 июня 2008 г.; публикации заявки на патент США № 20100234572 A1, опубликованной 16 сентября 2010 г.; публикации заявки на патент США № 20120225058 A1, опубликованной 6 сентября 2012 г.; публикация заявки на патент США № 20150337053 A1, опубликованной 26 ноября 2015 г.; международной публикации № WO20/16161010A2, опубликованной 6 октября 2016 г.; US 9359437, выданной 7 июня 2016 г.; и патенте США № 10053517, выданном 21 августа 2018 г., все из которых включены в данный документ посредством ссылки.

[0127] С-концевые лизины (-К), консервативные в генах тяжелых цепей всех подклассов человеческого IgG, обычно отсутствуют в антителах, циркулирующих в сыворотке, С-концевые лизины отщепляются в кровотоке, что приводит к гетерогенной популяции циркулирующих IgG (van den Bremer et al., 2015, mAbs 7: 672-680). В векторных конструкциях для полноразмерных мкАт ДНК, кодирующая С-концевой лизин (-К) или глицин-лизин (-GК) конца Fc, может быть удалена для получения более гомогенного препарата на основе антител *in situ*. (См. Hu et al., 2017 Biotechnol. Prog. 33: 786-794, полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки).

5.2.9 Производство и тестирование векторов

[0128] Предлагаемые в данном документе вирусные векторы могут быть изготовлены с использованием клеток-хозяев. Предлагаемые в данном документе вирусные векторы могут быть произведены с использованием клеток-хозяев млекопитающих, например, A549, WENI, 10T1/2, BHK, MDCK, COS1, COS7, BSC 1, BSC 40, BMT 10, VERO, W138, HeLa, 293, Saos, C2C12, L, HT1080, HepG2, первичные фибробласты, гепатоциты и миобластные клетки. Предлагаемые в данном документе вирусные векторы могут быть получены с использованием клеток-хозяев от человека, обезьяны, мыши, крысы, кролика или хомяка.

[0129] Клетки-хозяева стабильно трансформируются последовательностями, кодирующими трансген и связанные элементы (например, векторный геном), и средствами продуцирования вирусов в клетках-хозяевах, например, генами репликации и капсида (например, генами гер и сар AAV). Для получения информации о способе получения рекомбинантных векторов AAV с капсидами AAV8 см. Раздел IV Подробного описания

патента США № 7282199 B2, который полностью включен в данный документ посредством ссылки. Титры копий генома указанных векторов можно определить, например, с помощью анализа TAQMAN®. Вирионы могут быть извлечены, например, путем осаждения CsCl₂.

[0130] Альтернативно, системы экспрессии бакуловирусов в клетках насекомых можно использовать для получения векторов AAV. Для обзора см. Aronte-Ubillus et al., 2018, Appl. Microbiol. Biotechnol. 102:1045-1054, который полностью включен в данный документ посредством ссылки в отношении производственных технологий.

[0131] Анализы *in vitro*, например, анализ культуры клеток, могут быть использованы для измерения экспрессии трансгена из вектора, описанного в данном документе, что указывает, например, на эффективность вектора. Например, линия клеток PER.C6® (Lonza), линия клеток, полученная из эмбриональных клеток сетчатки человека, или клетки пигментного эпителия сетчатки, например, линия клеток пигментного эпителия сетчатки hTERT RPE-1 (доступна в ATCC®), могут быть использованы для оценки экспрессии трансгена. После экспрессии можно определить характеристики экспрессированного продукта, включая определение паттернов гликозилирования и сульфатирования тирозина, связанных с человеческим гликозилированным Fc-слитым белком к TNF α . Модели гликозилирования и способы их определения обсуждаются в разделе 5.4. Кроме того, преимущества, возникающие в результате гликозилирования/сульфатирования экспрессируемых клетками гликозилированных Fc-слитых белков человека к TNF α , можно определить с помощью анализов, известных в данной области техники, например, методов, описанных в разделе 5.4.

[0132] Концентрацию генома вектора (ГК) или копии генома вектора можно оценить с помощью цифровой ПЦР (цПЦР) или ddPCR™ (BioRad Technologies, Геркулес, штат Калифорния, США). В одном примере образцы тканей глаза, такие как образцы водянистой влаги и/или стекловидного тела, получают в несколько моментов времени. В еще одном примере несколько мышей умерщвляют в различные моменты времени после инъекции. Образцы ткани глаза подвергают экстракции тотальной ДНК и анализу количества копий вектора с помощью цПЦР. Копии генома вектора (трансгена) на грамм ткани могут быть измерены в одном образце биопсии или измерены в различных срезах ткани в последовательные моменты времени, чтобы выявить распространение AAV по всему глазу. Тотальную ДНК из собранной глазной жидкости или ткани выделяют с помощью набора DNeasy Blood & Tissue Kit, а концентрацию ДНК измеряют с помощью спектрофотометра Nanodrop. Для определения количества копий вектора в каждом образце ткани проводят цифровую ПЦР с использованием системы Naica Crystal Digital PCR (технологии Stilla). Двухцветная система мультиплексирования применяется для одновременного измерения

трансгенного AAV и эндогенного контрольного гена. Вкратце, зонд трансгена можно пометить красителем FAM (6-карбоксихлорофлуоресцеин), а зонд эндогенного контроля можно пометить флуоресцентным красителем VIC. Количество копий доставленного вектора в конкретном срезе ткани на диплоидную клетку рассчитывают как: (количество копий вектора)/(эндогенный контроль) \times 2. Копия вектора в определенных типах клеток или тканях, таких как роговица, радужка, цилиарное тело, клетки шлеммова канала, трабекулярная сеть, клетки сетчатки, клетки ПЭС, ткань ПЭС-хориоида или клетки зрительного нерва, с течением времени может указывать на устойчивую экспрессию трансгена тканью.

5.2.9 Композиции

[0133] Фармацевтические композиции, подходящие для введения людям, включают суспензию рекомбинантного вектора в буфере для состава, содержащем физиологически совместимый водный буфер, поверхностно-активное вещество и необязательные эксципиенты. Такой буфер для состава может содержать один или более из полисахаридов, поверхностно-активных веществ, полимеров или масел. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит гAAV в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем для введения субъекту. В одном варианте осуществления термин «фармацевтически приемлемый» обозначает одобренный регуляторным ведомством Федерального правительства или правительством штата, или приведенный в Фармакопее США или другой общепризнанной фармакопее для применения для животных, а более конкретно для человека. Термин «носитель» относится к разбавителю, адьюванту (например, полному и неполному адьюванту Фрейнда), эксципиенту или средству, с помощью которого вводится агент. Такие фармацевтические носители могут представлять собой стерильные жидкости, такие как вода и масла, включая нефтяные масла, масла животного, растительного или синтетического происхождения, включая, например, арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и т. п. Вода является стандартным носителем при внутривенном введении фармацевтической композиции. Солевые растворы и водные растворы декстрозы и глицерина также можно использовать в качестве жидких носителей, в частности, для растворов для инъекций. Подходящие фармацевтические наполнители включают крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, мел, силикагель, стеарат натрия, моностеарат глицерин, тальк, хлорид натрия, сухое обезжиренное молоко, глицерин, пропиленгликоль, воду, этанол и т. п. Дополнительные примеры фармацевтически приемлемых носителей, эксципиентов и стабилизаторов включают, но не ограничиваются ими, буферы, такие как фосфат, цитрат и другие органические кислоты, антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту; полипептиды с низкой молекулярной массой; белки, такие

как сывороточный альбумин и желатин; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие агенты, такие как ЭДТА; сахарные спирты, такие как маннит или сорбитол; солеобразующие противоионы, такие как натрий; и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как TWEENTM, полиэтиленгликоль (PEG) и PLURONICSTM, известные в данной области техники. Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может также включать смазывающее вещество, смачивающий агент, подсластитель, ароматизатор, эмульгатор, суспендирующий агент и консервант в дополнение к вышеуказанным ингредиентам. Данные композиции могут находиться в форме растворов, суспензий, эмульсий, таблеток, пиллюль, капсул, порошков, составов с замедленным высвобождением и т. п.

5.3 Способы лечения неинфекционного увеита

[0134] В еще одном аспекте предложены способы лечения неинфекционного увеита или другой патологии, которые можно лечить Fc-слитым белком к TNF α у нуждающегося в этом субъекта, включающие введение рекомбинантных частиц AAV, содержащих кассету экспрессии, кодирующую Fc-слитый белок к TNF α и его варианты. Субъект, нуждающийся в этом, включает субъекта, имеющего неинфекционный увеит, или субъекта, предрасположенного к нему, например, субъекта с риском развития или рецидива неинфекционного увеита, или с другими патологиями, которые можно лечить с помощью Fc-слитого белка к TNF α . Субъекты, которым проводят такую генную терапию, могут быть субъектами, чувствительными к анти-TNF α , например, этанерцепту, адалимумабу, инфликсимабу или голимумабу. В конкретных вариантах осуществления способы включают лечение пациентов, у которых был диагностирован неинфекционный увеит, и, в некоторых вариантах осуществления, идентифицированных как чувствительных к лечению Fc-слитым белком к TNF α или считающихся подходящими кандидатами для терапии Fc-слитым белком к TNF α . В конкретных вариантах осуществления пациентов ранее лечили Fc-слитым белком к TNF α . Для определения чувствительности Fc-слитый белок к TNF α (например, продуцируемый в культуре клеток человека, биореакторах и т. д.) может быть введен непосредственно субъекту.

[0135] В конкретных вариантах осуществления предложены способы лечения неинфекционного увеита или другой патологии, которые поддаются лечению Fc-слитым белком к TNF α , у человека, нуждающегося в этом, включающие: введение в глаз (или печень и/или мышцу) указанному субъекту терапевтически эффективного количества

рекомбинантного нуклеотидного вектора экспрессии, содержащего трансген, кодирующий область Fc Fc-слитого белка к TNF α , функционально связанный с одной или более регуляторными последовательностями, которые контролируют экспрессию трансгена в клетках ткани глаза человека, так что образуется депо, которое высвобождает чПМ форму мкАт или его антигенсвязывающего фрагмента. Субретинальное, интравитреальное, интракамеральное или супрахориоидальное введение должно приводить к экспрессии растворимого продукта трансгена в одном или более из следующих типов клеток сетчатки: фоторецепторные клетки человека (колбочки, палочки); горизонтальные клетки; биполярные клетки; амакриновые клетки; ганглиозные клетки сетчатки (карликовые клетки, зонтичные клетки, двуслойные клетки, гигантские ганглиозные клетки сетчатки, светочувствительные ганглиозные клетки и мюллеровские глиальные клетки); и клетки пигментного эпителия сетчатки или другие клетки ткани глаза: клетки роговицы, клетки радужной оболочки, клетки цилиарного тела, клетки шлеммова канала, клетки трабекулярной сети, клетки ткани ПЭС-хориоидеи или клетки зрительного нерва.

[0136] Рекомбинантные векторы и фармацевтические композиции для лечения заболеваний или нарушений у субъекта, нуждающегося в этом, описаны в разделе 5.2. Такие векторы должны обладать тропностью к ткани глаза человека или к клеткам печени и/или мышц и могут включать нереплицирующиеся гAAV, особенно те, которые несут капсид AAV2.7m8, AAV3B, AAV8, AAV9, AAV10, AAVrh10 или AAVrh73. Рекомбинантные векторы можно вводить любым способом так, чтобы рекомбинантный вектор проникал в клетки ткани глаза, например, путем введения рекомбинантного вектора в глаз. Такие векторы должны дополнительно содержать одну или более регуляторных последовательностей, которые контролируют экспрессию трансгена в клетках ткани глаза человека и/или клетках печени и мышц человека, включая, но не ограничиваясь ими, промотор родопсинкиназы человека (GRK1) (SEQ ID NO:54 или 117), промотор аррестина колбочек мыши (CAR) (SEQ ID NO: 114-116), промотор красного опсина человека (RedO) (SEQ ID NO: 112) или промотор Best1/GRK (SEQ ID NO: 161) (см. также таблицы 1 и 1a).

5.4 N-ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЕ, СУЛЬФАТИРОВАНИЕ ТИРОЗИНА И O-ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЕ

[0137] Аминокислотная последовательность (первичная последовательность) чПМ Fc-слитых белков к TNF α , описанных в данном документе, содержит по меньшей мере один сайт, в котором происходит N-гликозилирование или O-гликозилирование (см. **Фиг. 2А и 2В**) для положений гликозилирования в аминокислотных последовательностях Fc-слитых белков). Посттрансляционная модификация также происходит в домене Fc полноразмерных антител, особенно в остатке N297 (по нумерации EU, см. **Фиг. 4**).

[0138] Альтернативно, мутации могут быть введены в домен Fc для изменения сайта гликозилирования по остатку N297 (нумерация EU, см. Фиг. 4), в частности, путем замены аспарагина на 297 или треонина на 299 другой аминокислотой для удаления сайта гликозилирования, что приводит к образованию агликозилированного домена Fc.

5.4.1 N-гликозилирование

Сайты обратного гликозилирования

[0139] Каноническая последовательность N-гликозилирования, как известно в данной области техники, представляет собой Asn-X-Ser (или Thr), где X может быть любой аминокислотой, кроме Pro. Однако недавно было продемонстрировано, что остатки аспарагина (Asn) человеческих антител могут быть гликозилированы в контексте обратного консенсусного мотива, Ser (или Thr)-X-Asn, где X может быть любой аминокислотой, кроме Pro. См. Valliere-Douglass et al., 2009, J. Biol. Chem. 284:32493-32506; and Valliere-Douglass et al., 2010, J. Biol. Chem. 285:16012-16022. Как описано в данном документе, некоторые Fc-слитые белки к TNF α , описанные в данном документе, содержат канонические и/или обратные консенсусные последовательности.

Неконсенсусные сайты гликозилирования

[0140] В дополнение к сайтам обратного N-гликозилирования недавно было продемонстрировано, что остатки глутамина (Gln) человеческих антител могут быть гликозилированы в контексте неконсенсусного мотива Gln-Gly-Thr. См. Valliere-Douglass et al., 2010, J. Biol. Chem. 285:16012-16022. Удивительно, но некоторые из описанных в данном документе фрагментов HuGlyFab содержат такие неконсенсусные последовательности. Кроме того, O-гликозилирование включает добавление ферментом N-ацетилгалактозамина к остаткам серина или треонина. Было продемонстрировано, что аминокислотные остатки, присутствующие в шарнирной области антител, могут быть O-гликозилированы. Возможность O-гликозилирования дает еще одно преимущество терапевтическим Fc-слитым белкам к TNF α , представленным в данном документе, по сравнению, например, с антигенсвязывающими фрагментами, продуцируемыми в *E. coli*, опять же потому, что *E. coli* в природе не имеет механизмов, эквивалентных тем, которые используются в O-гликозилировании в организме человека. (Вместо этого O-гликозилирование в *E. coli* было продемонстрировано только тогда, когда бактерии были модифицированы, чтобы иметь специфический механизм O-гликозилирования. См., например, Farid-Moayer et al., 2007, J. Bacteriol. 189:8088-8098.)

Сконструированные сайты N-гликозилирования

[0141] В определенных вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая Fc-слитый белок к TNF α , модифицирована для включения 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8,

9, 10 или более сайтов N-гликозилирования (включая каноническую консенсусную последовательность N-гликозилирования, сайт обратного N-гликозилирования и неконсенсусные сайты N-гликозилирования), чем обычно ассоциируется со чПМ Fc-слитым белком к TNF α (например, относительно количества сайтов N-гликозилирования, связанных с чПМ Fc-слитым белком к TNF α в его немодифицированном состоянии). В конкретных вариантах осуществления введение сайтов гликозилирования осуществляется путем вставки сайтов N-гликозилирования (включая каноническую консенсусную последовательность N-гликозилирования, сайт обратного N-гликозилирования и неконсенсусные сайты N-гликозилирования) в любом месте первичной структуры антигенсвязывающего фрагмента при условии, что указанное введение не влияет на связывание антитела или антигенсвязывающего фрагмента с его антигеном. Введение сайтов гликозилирования можно осуществить, например, путем добавления новых аминокислот в первичную структуру растворимого внеклеточного домена TNFR или домена Fc (например, сайты гликозилирования добавляются полностью или частично) или путем мутации существующих аминокислот в растворимом внеклеточном домене TNFR или домене Fc для создания сайтов N-гликозилирования (например, аминокислоты не добавляются, а выбранные аминокислоты Fc-слитого белка к TNF α подвергают мутации с образованием сайтов N-гликозилирования). Специалисты в данной области поймут, что аминокислотная последовательность белка может быть легко модифицирована с использованием подходов, известных в данной области техники, например, рекомбинантных подходов, которые включают модификацию последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей белок.

[0142] В конкретном варианте осуществления Fc-слитый белок к TNF α модифицирован таким образом, что при экспрессии в клетках млекопитающих, таких как сетчатка, ЦНС, печень или мышечные клетки, он может быть гипергликозилирован.

N-гликозилирование чПМ Fc-слитых белков к TNF α

[0143] В отличие от низкомолекулярных лекарственных средств, биологические препараты обычно включают смесь многих вариантов с различными модификациями или формами, которые могут иметь различную эффективность, фармакокинетику и/или профиль безопасности. Необязательно, чтобы каждая молекула, полученная с помощью генной терапии или протеинотерапии, была полностью гликозилирована и сульфатирована. Точнее, совокупность продуцируемых гликопротеинов должна иметь достаточное гликозилирование (включая 2,6-сиалирование) и сульфатирование, чтобы продемонстрировать эффективность. Целью генной терапии, представленной в данном документе, может быть, например, замедление или остановка прогрессирования

заболевания или патологического состояния или уменьшение тяжести одного или более симптомов, связанных с заболеванием или патологическим состоянием.

[0144] Когда чПМ Fc-слитый белок к TNF α экспрессируется в клетке человека, сайты N-гликозилирования Fc-слитого белка могут быть гликозилированы различными гликанами. Гликозилирование домена Fc было охарактеризовано и представляет собой единственный N-связанный гликан по аспарагину 297 (нумерация EU; см. Фиг. 4). Гликан играет интегральную структурную и функциональную роль, влияя на эффекторную функцию антитела, такую как связывание с рецептором Fc (см., например, Jennewein and Alter, 2017, Trends In Immunology 38: 358, где обсуждается роль гликозилирования Fc в функции антитела). Удаление гликана области Fc почти полностью устраняет эффекторную функцию (Jennewien and Alter, 362). Было показано, что состав гликана Fc влияет на эффекторную функцию, например, было показано, что гипергалактозилирование и снижение фукозилирования увеличивает активность АЗКЦ, в то время как сиалирование коррелирует с противовоспалительными эффектами (*Id.* at 364). Течение заболевания, генетика и даже диета могут влиять на состав гликана Fc *in vivo*. Для рекомбинантно экспрессируемых антител и Fc-слитых белков состав гликанов может значительно отличаться в зависимости от типа клетки-хозяина, используемой для рекомбинантной экспрессии, и доступны стратегии для контроля и модификации состава гликана в терапевтических антителах, рекомбинантно экспрессируемых в культуре клеток, таких как CHO, для изменения эффекторной функции (см., например, US 2014/0193404 Hansen et al.). Соответственно, Fc-слитые белки к TNF α , представленные в данном документе, могут преимущественно иметь гликан по N297, который больше похож на нативный состав гликанов у человека, чем на антитела, экспрессируемые в нечеловеческих клетках-хозяевах.

[0145] Важно отметить, что когда чПМ Fc-слитые белки к TNF α экспрессируются в клетках человека, отпадает необходимость в продукции *in vitro* в прокариотических клетках-хозяевах (например, *E. coli*) или эукариотических клетках-хозяевах (например, клетках CHO или клетках NS0). Вместо этого, в результате способов, описанных в данном документе, сайты N-гликозилирования чПМ Fc-слитых белков к TNF α предпочтительно украшены гликанами, имеющими отношение к лечению человека и полезными для них. Такое преимущество недостижимо, если в получении антитела / антигенсвязывающего фрагмента используются клетки CHO, клетки NS0 или *E. coli*, потому что, например, клетки CHO (1) не экспрессируют 2,6-сиалилтрансферазу и, таким образом, не могут добавлять 2,6 сиаловую кислоту во время N-гликозилирования; (2) могут добавить Neu5Gc в качестве сиаловой кислоты вместо Neu5Ac; и (3) могут также продуцировать иммуногенный гликан, антиген α -Gal, который реагирует с антителами к α -Gal, присутствующими у большинства

людей, которые в высоких концентрациях могут вызывать анафилаксию; и потому что (4) *E. coli* в природе не содержит компонентов, необходимых для N-гликозилирования.

[0146] Анализы для определения характера гликозилирования Fc-слитых белков к TNF α известны в данной области техники. Например, гидразинолиз можно использовать для анализа гликанов. Во-первых, полисахариды высвобождаются из связанного с ними белка путем инкубации с гидразином (можно использовать набор Ludger Liberate Hydrazinolysis Glycan Release, Оксфордшир, Великобритания). Нуклеофильный гидразин атакует гликозидную связь между полисахаридом и белком-носителем и позволяет высвободить присоединенные гликаны. N-ацетильные группы теряются во время этой обработки и должны быть восстановлены путем повторного N-ацетилирования. Гликаны также могут высвобождаться с использованием ферментов, таких как гликозидазы или эндогликозидазы, такие как ПНГаза F и эндогликозидаза H, которые расщепляются чисто и с меньшим количеством побочных реакций, чем гидразины. Свободные гликаны могут быть очищены на угольных колонках и впоследствии помечены на восстанавливающем конце с флуорофором 2-аминобензамидом. Меченые полисахариды могут быть разделены на колонке GlycoSep-N (GL Sciences) в соответствии с протоколом ВЭЖХ Royle et al, Anal Biochem 2002, 304(1):70-90. Полученная флуоресцентная хроматограмма демонстрирует длину полисахарида и количество повторяющихся звеньев. Структурная информация может быть собрана путем сбора индивидуальных пиков и последующего анализа методом МС/МС. Таким образом, моносахаридный состав и последовательность повторяющихся звеньев могут быть подтверждены и, кроме того, может быть идентифицирована гомогенность полисахаридного состава. Конкретные пики с низкой или высокой молекулярной массой можно анализировать с помощью МАЛДИ-МС/МС, а результат использовать для подтверждения гликановой последовательности. Каждый пик на хроматограмме соответствует полимеру, например, гликану, состоящему из определенного числа повторяющихся звеньев и их фрагментов, например остатков сахара. Таким образом, хроматограмма позволяет измерить распределение длины полимера, например, гликана. Время элюирования является показателем длины полимера, в то время как интенсивность флуоресценции коррелирует с молярным содержанием для соответствующего полимера, например, гликана. Другие методы оценки гликанов, связанных с Fc-слитыми белками к TNF α , включают методы, описанные Montacir et al., 2018, The Protein Journal, 37(2), 164–179.

[0147] Гомогенность или гетерогенность гликановых профилей, связанных с Fc-слитыми белками к TNF α , поскольку это относится как к длине или размеру гликанов, так и к количеству гликанов, присутствующих в сайтах гликозилирования, можно оценить с

помощью способов, известных в данной области техники, например, способов, при помощи которых измеряют длину или размер и гидродинамический радиус гликана. ВЭЖХ, такая как гель-фильтрация, нормальная фаза, обращенная фаза и анионообменная ВЭЖХ, а также капиллярный электрофорез позволяют измерять гидродинамический радиус. Более высокое количество сайтов гликозилирования в белке приводит к большему изменению гидродинамического радиуса по сравнению с носителем с меньшим количеством сайтов гликозилирования. Однако при анализе одиночных гликановых цепей они могут быть более гомогенными из-за более контролируемой длины. Длина гликана может быть измерена с помощью гидразинолиза, ДСН-ПААГ-электрофореза и капиллярного гель-электрофореза. Кроме того, гомогенность также может означать, что определенные профили использования сайтов гликозилирования изменяются в сторону более широкого / узкого диапазона. Эти факторы можно измерить с помощью ЖХ-МС/МС гликопептида.

[0148] В определенных вариантах осуществления чПМ Fc-слитыми белками к TNF α также не содержат детектируемого NeuGc и/или α -Gal. Под «детектируемым NeuGc», «детектируемым α -Gal» или «не содержит или не имеет NeuGc или α -Gal» в данном документе подразумевается, что чПМ Fc-слитый белок к TNF α не содержит фрагментов NeuGc или α -Gal, обнаруживаемых с помощью стандартных способов анализа, известные в данной области техники. Например, NeuGc может быть обнаружен с помощью ВЭЖХ согласно Hara et al., 1989, “Highly Sensitive Determination of *N*-Acetyl- and *N*-Glycolylneuraminic Acids in Human Serum and Urine and Rat Serum by Reversed-Phase Liquid Chromatography with Fluorescence Detection.” J. Chromatogr., B: Biomed. 377, 111–119, который включен в данный документ посредством ссылки для способа обнаружения NeuGc. В качестве альтернативы NeuGc может быть обнаружен при помощи масс-спектрометрии. α -Gal может быть обнаружен с помощью ИФА, см., например, Galili et al., 1998, “A sensitive assay for measuring α -Gal epitope expression on cells by a monoclonal anti-Gal antibody.” Transplantation. 65(8):1129-32, или с помощью масс-спектрометрии, см., например, Ayoub et al., 2013, “Correct primary structure assessment and extensive glyco-profiling of cetuximab by a combination of intact, middle-up, middle-down and bottom-up ESI and MALDI mass spectrometry techniques.” Landes Bioscience. 5(5):699–710. Также ссылки, цитируемые в Platts-Mills et al., 2015, “Anaphylaxis to the Carbohydrate Side-Chain Alpha-gal” Immunol Allergy Clin North Am. 35(2): 247–260.

Преимущества N-гликозилирования

[0149] N-гликозилирование придает многочисленные преимущества описанным в данном документе чПМ Fc-слитым белкам к TNF α . Такие преимущества недостижимы при продукции Fc-слитых белков к TNF α в *E. coli*, потому что *E. coli* в природе не содержит

компонентов, необходимых для N-гликозилирования. Кроме того, некоторые преимущества недостижимы посредством продукции антител, например, в клетках CHO (или мышинных клетках, таких как клетки NS0), потому что в клетках CHO отсутствуют компоненты, необходимые для добавления определенных гликанов (например, 2,6-сиаловой кислоты и GlcNAc в точках ветвления) и потому что либо CHO, либо мышинные линии клеток добавляют N-N-гликолилнейраминовую кислоту («Neu5Gc» или «NeuGc»), которая не является естественной для человека (и потенциально иммуногенной), вместо N-ацетилнейраминовой кислоты («Neu5Ac»), преобладающей сиаловой кислоты человека. См., например, Dumont et al., 2015, Crit. Rev. Biotechnol. 36(6):1110-1122; Huang et al., 2006, Anal. Biochem. 349:197-207 (NeuGc является преобладающей сиаловой кислотой в линиях мышинных клеток, таких как SP2/0 и NS0); а также Song et al., 2014, Anal. Chem. 86:5661-5666, каждый из которых полностью включен в данный документ посредством ссылки. Более того, клетки CHO могут также продуцировать иммуногенный гликан, антиген α -Gal, который реагирует с антителами к α -Gal, присутствующими у большинства людей, которые в высоких концентрациях могут вызывать анафилаксию. См., например, Vosques, 2010, Nat. Biotech. 28:1153-1156. Характер человеческого гликозилирования чПМ Fc-слитых белков к TNF α , описанных в данном документе, должен снижать иммуногенность продукта трангена и улучшать эффективность.

[0150] Хотя неканонические сайты гликозилирования, как правило, приводят к низкому уровню гликозилирования (например, 1-5%) популяции Fc-слитых белков к TNF α , функциональные преимущества могут быть значительными (см., например, van de Vovenkamp et al., 2016, J. Immunol. 196:1435-1441). Например, гликозилирование может влиять на стабильность, время полужизни и характеристики связывания антитела. Для определения эффектов гликозилирования Fc-слитых белков к TNF α на аффинность слитого белка к его мишени можно использовать любой способ, известный специалисту в данной области техники, например, иммуноферментный анализ (ИФА) или поверхностный плазмонный резонанс (ППР). Для определения эффектов гликозилирования на время полужизни чПМ Fc-слитых белков к TNF α можно использовать любую методику, известную специалисту в данной области техники, например, путем измерения уровней радиоактивности в крови или органах у субъекта, у которого было введено радиоактивно меченное антитело. Для определения эффектов гликозилирования на стабильность, например, уровни агрегации или разворачивания Fc-слитых белков к TNF α , может быть использован любой способ, известный специалисту в данной области техники, например, дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК), высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), например, эксклюзионная высокоэффективная жидкостная

хроматография (ЭХ-ВЭЖХ), капиллярный электрофорез, масс-спектрометрия или измерение мутности.

[0151] Присутствие сиаловой кислоты на чПМ Fc-слитых белках к TNF α , используемых в способах, описанных в данном документе, может влиять на скорость клиренса чПМ Fc-слитых белках к TNF α . Соответственно, образцы сиаловой кислоты для чПМ Fc-слитых белков к TNF α можно использовать для создания терапевтического средства с оптимизированной скоростью клиренса. Способы оценки скорости клиренса Fc-слитых белков к TNF α известны в данной области техники.

[0152] В еще одном конкретном варианте осуществления преимущество, обеспечиваемое N-гликозилированием, представляет собой снижение агрегации. Занятые сайты N-гликозилирования могут маскировать склонные к агрегации аминокислотные остатки, что приводит к снижению агрегации. Такие сайты N-гликозилирования могут быть нативными для Fc-слитого белка к TNF α , используемого в данном документе, или могут быть сконструированы в составе антигенсвязывающего фрагмента, используемого в данном документе, что приводит к получению чПМ Fc-слитых белков к TNF α , которые менее склонны к агрегации при экспрессии, например, экспрессируется в клетках человека. Способы оценки агрегации антител известны в данной области техники. См., например, Courtois et al., 2016, mAbs 8:99-112, который полностью включен в данный документ посредством ссылки.

[0153] В еще одном конкретном варианте осуществления преимущество, обеспечиваемое N-гликозилированием, представляет собой снижение иммуногенности. Такие сайты N-гликозилирования могут быть нативными для антигенсвязывающего фрагмента, используемого в данном документе, или могут быть встроены в антигенсвязывающий фрагмент, используемый в данном документе, что приводит к получению чПМ Fc-слитого белка к TNF α , который менее склонен к иммуногенности при экспрессии, например, при экспрессии в клетках ткани глаза человека.

[0154] В еще одном конкретном варианте осуществления преимуществом, обеспечиваемым N-гликозилированием, является стабильность белка. Хорошо известно, что N-гликозилирование белков придает им стабильность, и в данной области техники известны способы оценки стабильности белков, возникающих в результате N-гликозилирования. См., например, Sola and Griebenow, 2009, J Pharm Sci., 98(4): 1223–1245.

[0155] В еще одном конкретном варианте осуществления преимущество, обеспечиваемое N-гликозилированием, представляет собой измененную аффинность связывания. В данной области техники известны анализы для измерения аффинности связывания.

5.4.2 О-гликозилирование

[0156] О-гликозилирование включает добавление ферментом N-ацетилгалактозамина к остаткам серина или треонина. Было продемонстрировано, что аминокислотные остатки, присутствующие в шарнирной области Fc-слитых белков к TNF α , могут быть О-гликозилированы. В определенных вариантах осуществления Fc-слитые белки к TNF α включают всю или часть их шарнирной области и, таким образом, способны быть О-гликозилированными при экспрессии в клетках человека. Возможность О-гликозилирования придает еще одно преимущество Fc-слитым белкам к TNF α , представленным в данном документе, по сравнению, например, с Fc-слитыми белками к TNF α , продуцируемыми в *E. coli*, опять же потому, что *E. coli* в природе не имеет механизмов, эквивалентных тем, которые используются в О-гликозилировании в организме человека. (Вместо этого О-гликозилирование в *E. coli* было продемонстрировано только тогда, когда бактерии были модифицированы, чтобы иметь специфический механизм О-гликозилирования. См., например, Farid-Moayer et al., 2007, J. Bacteriol. 189:8088-8098.) О-гликозилированные Fc-слитые белки к TNF α благодаря содержанию гликанов имеют общие полезные характеристики с N-гликозилированными Fc-слитыми белками к TNF α (как обсуждалось выше).

5.5 Векторизированные конструкции чПМ Fc-слитого белка к TNF α и составы для лечения неинфекционного увеита

[0157] Описаны композиции и способы доставки чПМ Fc-слитых белков к TNF α , таких как слитые белки TNFR1:Fc или слитые белки TNFR2:Fc, которые связываются с фактором некроза опухоли-альфа (TNF α , такие как этанерцепт или EYS606, (Фиг. 2А и 2В) и показаны для лечения неинфекционного увеита. В определенных вариантах осуществления чПМ Fc-слитый белок к TNF α имеет аминокислотную последовательность этанерцепта или EYS606, или их биоаналоги или биопрепараты с улучшенными характеристиками. Аминокислотные последовательности растворимой, внеклеточной части человеческого рецептора TNF α типа I (TNFR1) или типа II (TNFR2) и доменов Fc слитых белков представлены на Фиг. 2А и 2В и в таблице 6. Доставка может быть осуществлена с помощью генной терапии, например, путем введения вирусного вектора или другой конструкции для экспрессии ДНК, кодирующей терапевтический Fc-слитый белок к TNF α (и/или его гипергликозилированное производное или другое производное), пациентам (субъектам-людям), у которых выявлено один или более симптомов неинфекционного увеита, для создания постоянного депо, которое непрерывно поставляет чПМ, например, человеческий гликозилированный продукт транскена, в ткани глаза.

Трансгены

[0158] Предложены рекомбинантные векторы, содержащие трансген, кодирующий чПМ Fc-слитый белок к TNF α , который связывается с TNF α , которые можно вводить для доставки чПМ Fc-слитого белка к TNF α пациенту. Трансген представляет собой нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидные последовательности, кодирующие Fc-слитый белок к TNF α , содержащий растворимую внеклеточную часть рецептора TNF α человека типа I (TNFR1) или типа II (TNFR2) и домен Fc, такой как этанерцепт или EYS606 или их варианты, как подробно описано в данном документе. Трансген может также кодировать Fc-слитый белок к TNF α , который содержит дополнительные сайты гликозилирования (например, см. Courtois et al.).

[0159] В определенных вариантах осуществления трансген анти-TNF α содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую слитый белок TNFR2:Fc этанерцепт (имеющий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 10 или 11, см. таблицу 6 и Фиг. 2A). Нуклеотидные последовательности могут быть оптимизированы по кодонам для экспрессии в клетках человека. Нуклеотидные последовательности могут, например, включать нуклеотидные последовательности SEQ ID NO: 13-18, кодирующие последовательности трансгена этанерцепта, как указано в таблице 7. Последовательности слитого белка TNFR2:Fc имеют сигнальную или лидерную последовательность на соответствующем N-конце для экспрессии и секреции в клетках человека, в частности, в одной или более клетках ткани глаза. Сигнальная последовательность может иметь аминокислотную последовательность MYRMQLLIALLSLALVTNS (SEQ ID NO: 62). Альтернативно, сигнальная последовательность может иметь аминокислотную последовательность, выбранную из любой из сигнальных последовательностей, представленных в таблице 2, которые соответствуют белкам, секретлируемым одной или более клетками ткани глаза. Альтернативно, сигнальная последовательность может подходить для экспрессии в мышечных клетках или клетках печени, таких как те, что перечислены в таблицах 3 и 4 ниже.

[0160] В дополнение к растворимому внеклеточному белку домена TNFR типа 2 и константной области Fc, включающей последовательности доменов C_H2 и C_H3, трансген может содержать на N-конце последовательности домена C_H2 тяжелой цепи всю или часть шарнирной области. В конкретных вариантах осуществления домен Fc имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 с дополнительной последовательностью шарнирной области на N-конце (например, SEQ ID NO: 3 с шарниром) или содержит всю или часть аминокислотной последовательности EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG (SEQ ID NO:145), и, в частности, EPKSCDKTHL (SEQ ID

NO:146), EPKSCDKTHT (SEQ ID NO:147), EPKSCDKTHTCPPCPA (SEQ ID NO:148), EPKSCDKTHLCPPCPA (SEQ ID NO:149), EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL (SEQ ID NO:150) или EPKSCDKTHLCPPCPAPELLGGPSVFL (SEQ ID NO:151). Домен Fc слитого белка к TNF α может иметь аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 или 4 (таблица 6) или домен Fc IgG1, как показано на Фиг. 4, или их мутант, или вариант. Домен Fc может быть сконструирован для изменения связывания с одним или более рецепторами Fc и/или эффекторной функции, как описано в разделе 5.2.8 ниже.

[0161] Экспрессия этанерцепта может быть направлена конститутивным или тканеспецифическим промотором. В определенных вариантах осуществления трансген содержит промотор CAG (SEQ ID NO:51), промотор CB (SEQ ID NO:159), промотор CBLong (SEQ ID NO:161), промотор GRK1 (SEQ ID NO:54) или промотор Best1/GRK (SEQ ID NO: 161). Альтернативно, промотор может быть тканеспецифическим промотором (или регуляторной последовательностью, включающей промоторные и энхансерные элементы), такой как промотор GRK1 (SEQ ID NO: 54 или 117), (промотор аррестина колбочек мыши (CAR) (SEQ ID NO: 114-116), промотор красного опсина человека (RedO) (SEQ ID NO: 112) или промотор Best1/GRK (SEQ ID NO: 161). См. Фиг. 1, на которой схематически показана геномная конфигурация. Трансгены могут содержать элементы, представленные в таблице 1. Примеры трансгенов, кодирующих этанерцепт, представлены в таблице 7 и включают CAG.etanercept (SEQ ID NO: 16) или mU1a.Vh4i.etanercept.scAAV (SEQ ID NO: 18). Последовательности ITR добавляются к 5'- и 3'-концам конструкций для получения геномов, приводящих к образуют CAG.etanercept (SEQ ID NO: 15) и U1a.Vh4i.etanercept.scAAV (SEQ ID NO: 17). В определенных вариантах осуществления конструкция представляет собой самокомплементарную конструкцию. Трансгены могут быть упакованы в AAV, в частности AAV2.7m8, AAV8, AAV3B или AAVrh73.

[0162] В определенных вариантах осуществления трансген кодирует Fc-слитый белок к TNF α , содержащий растворимую внеклеточную часть домена TNFR типа 2, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 2. В определенных вариантах осуществления трансген кодирует Fc-слитый белок к TNF α , содержащий домен Fc, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92 %, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 3. В определенных вариантах осуществления трансген кодирует Fc-слитый белок к TNF α , содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%,

93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 10 или 11. В конкретных вариантах осуществления слитый белок TNFR2:Fc, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10 или 11 с 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или более аминокислотными заменами, вставками или делециями, а также производятся замены, вставки или делеции.

[0163] В определенных вариантах осуществления трансген к TNF α содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую слитый белок TNFR1:Fc EYS606 (имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, см. таблицу 6 и Фиг. 2B). Нуклеотидные последовательности могут быть оптимизированы по кодонам для экспрессии в клетках человека. Слитый белок TNFR1:Fc имеет сигнальную или лидерную последовательность на N-конце, подходящую для экспрессии и секреции в клетках человека, в частности, в одной или более клетках, образующих сетчатку. Сигнальная последовательность может иметь аминокислотную последовательность MYRMQLLIALLSLALVTNS (SEQ ID NO: 62). Альтернативно, сигнальная последовательность может иметь аминокислотную последовательность, выбранную из любой из сигнальных последовательностей, представленных в таблице 2, которые соответствуют белкам, секретиремым одной или более клетками ткани глаза. Альтернативно, сигнальная последовательность может подходить для экспрессии в мышечных клетках или клетках печени, таких как те, что перечислены в таблицах 3 и 4 ниже.

[0164] В дополнение к растворимому внеклеточному белку домена TNFR типа 1 и константной области Fc, включающей последовательности доменов C_{H2} и C_{H3}, трансген может содержать на N-конце последовательности домена C_{H2} тяжелой цепи сайт расщепления тромбином LVPRGS (SEQ ID NO:8) и всю или часть шарнирной области. В конкретных вариантах осуществления домен Fc имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 или имеет последовательность шарнирной области на N-конце, содержащую всю или часть аминокислотной последовательности DKTHTCPPCPAPELLGG (SEQ ID NO:21), и, в частности, DKTHTCPPCPA (SEQ ID NO:154), DKTHLCPPCPA (SEQ ID NO:155), DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL (SEQ ID NO:152) или DKTHLCPPCPAPELLGGPSVFL (SEQ ID NO:156). Домен Fc Fc-слитого белка к TNF α может иметь аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10 (таблица 6). Домен Fc может быть сконструирован для изменения связывания с одним или более рецепторами Fc и/или эффекторной функции, как описано в разделе 5.2.8 ниже.

[0165] Экспрессия EYS606 может быть направлена конститутивным или тканеспецифическим промотором. В определенных вариантах осуществления трансген

содержит промотор CAG (SEQ ID NO:51) или промотор GRK1 (SEQ ID NO:54). Альтернативно, промотор может быть тканеспецифическим промотором (или регуляторной последовательностью, включающей промоторные и энхансерные элементы), такой как промотор GRK1 (SEQ ID NO: 54 или 117), (промотор аррестина колбочек мыши (CAR) (SEQ ID NO: 114-116), промотор красного опсина человека (RedO) (SEQ ID NO:112) или промотор Best1/GRK (SEQ ID NO:161). Трансгены могут содержать элементы, представленные в таблице 1. Примеры трансгенов, кодирующих EYS606, могут быть получены с использованием способов, известных в данной области техники. Последовательности ITR добавляются к 5' - и 3- концам конструкций для создания геномов. Трансгены могут быть упакованы в AAV, в частности AAV8, AAV3B, или AAVrh73.

[0166] В определенных вариантах осуществления трансген кодирует Fc-слитый белок к TNF α , содержащий растворимую внеклеточную часть домена TNFR типа 1, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 1. В определенных вариантах осуществления трансген кодирует Fc-слитый белок к TNF α , содержащий домен Fc, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92 %, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 6. В определенных вариантах осуществления трансген кодирует Fc-слитый белок к TNF α , содержащий аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 12. В конкретных вариантах осуществления слитый белок TNFR1:Fc содержит растворимую внеклеточную часть домена TNFR типа 1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 с 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или более аминокислотными заменами, вставками или делециями, а также производятся замены, вставки или делеции. В конкретных вариантах осуществления слитый белок TNFR1:Fc содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12 с 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или более аминокислотными заменами, вставками или делециями, а также производятся замены, вставки или делеции, например, в каркасных областях.

Способы генной терапии

[0167] Предложены способы лечения у людей неинфекционного увеита путем введения вирусного вектора, содержащего трансген, кодирующий слитый белок к TNF α . Слитым белком может быть этанерцепт или EYS606, или их биопрепараты с улучшенными

характеристиками или биоаналоги. В вариантах осуществления у пациента диагностирован неинфекционный увеит и/или он имеет симптом(-ы). Рекомбинантный вектор, используемый для доставки трансгена, описан в разделе 5.2. Такие векторы должны обладать тропизмом к клеткам ткани глаза человека и могут включать нереплицирующиеся гAAV, особенно те, которые несут капсид AAV8, капсид AAV3B или капсид AAVr73. В качестве альтернативы векторы, несущие капсид AAV2.7m8 или AAV9, можно использовать для офтальмологических патологий. Рекомбинантный вектор, такой как показанный на Фиг. 1, можно вводить любым способом таким образом, чтобы рекомбинантный вектор проникал в один или более типов клеток ткани глаза, например, путем введения рекомбинантного вектора в глаз. Подробную информацию о способах лечения см. в разделе 5.3.

[0168] Предложены способы лечения людей от неинфекционного увеита путем введения вирусного вектора, содержащего трансген, кодирующий слитый белок к TNF α . Слитым белком может быть этанерцепт или EYS606. В вариантах осуществления у пациента диагностирован неинфекционный увеит и/или имеются симптомы, связанные с ним. Рекомбинантные векторы, используемые для доставки трансгена, описаны в разделе 5.2, а иллюстративные трансгены представлены выше. Такие векторы должны обладать тропизмом к клеткам ткани глаза человека и могут включать нереплицирующиеся гAAV, особенно те, которые несут капсид AAV3B, AAV8 или AAVrh73. Рекомбинантные векторы, такие как приведенные на Фиг. 2A и 2B, можно вводить любым способом, чтобы рекомбинантный вектор проник в ткань глаза. В конкретных вариантах осуществления трансген представляет собой SEQ ID NO: 13-18 в векторе AAV8 (см. таблицу 7).

[0169] Субъекты, для которых проводили такую генную терапию, могут представлять собой субъектов, которые отвечают на анти-TNF α терапию. В определенных вариантах осуществления способы включают лечение пациентов, у которых был диагностирован неинфекционный увеит или у которых имеется один или более симптомов, связанных с ним, и которые идентифицированы как чувствительные к лечению антителом к TNF α , Fc-слитым белком к TNF α или считающихся хорошим кандидатом для терапии антителом к TNF α или Fc-слитым белком к TNF α . В конкретных вариантах осуществления пациентов ранее лечили этанерцептом, адалимумабом, инфликсимабом или голимумабом, и было обнаружено, что они отвечают на этанерцепт, адалимумаб, инфликсимаб или голимумаб. В других вариантах осуществления пациенты ранее получали лечение антителом к TNF-альфа или слитым белком, таким как этанерцепт, цертолизумаб или другим агентом к TNF-альфа. Для определения чувствительности продукт трансгена к TNF α (например, полученный в клеточной культуре, биореакторах и т. д.) можно вводить непосредственно субъекту.

Человеческие посттрансляционно модифицированные слитые белки к TNF α

[0170] Продукция чПМ слитого белка к TNF α должно приводить к получению молекулы с «улучшенными характеристиками» для лечения неинфекционного увеита с помощью генной терапии, например, путем введения вирусного вектора или другой конструкции для экспрессии ДНК, кодирующей чПМ слитый белок к TNF α субретинально, интравитреально, интраназально, интракамерально, супрахориоидально или системно субъектам-людям (пациентам), у которых диагностирован или имеется один или более симптомов неинфекционного увеита, для создания постоянного депо в одной или более тканях глаза (или типах клеток), которое непрерывно обеспечивает полностью человеческий посттрансляционно модифицированный, например, человеческий гликозилированный, сульфатированный продукт трансгена, продуцируемый трансдуцированными клетками ткани глаза.

[0171] В конкретных вариантах осуществления чПМ слитый белок к TNF α имеет растворимую внеклеточную часть домена TNFR2, слитую с доменом Fc с аминокислотными последовательностями этанерцепта, как показано на Фиг. 2А (сайты гликозилирования по аспарагину (N), неконсенсусные сайты гликозилирования по аспарагину (N); указаны в легенде), имеет гликозилирование, в частности 2,6-сиалирование, в одном или более положениях аминокислот, указанных на Фиг. 2А, включая N149 или N171 домена TNFR2 (SEQ ID NO: 2) и/или N317 домена Fc (SEQ ID NO: 3), и/или сайты O-связанного гликозилирования в одном или более положениях аминокислот T8, T184, S199 и/или T200 домена TNFR2 (SEQ ID NO: 2) и/или T245 шарнирной области (SEQ ID NO: 11). В других вариантах осуществления чПМ слитый белок к TNF α не содержит какие-либо обнаруживаемые фрагменты NeuGc и/или не содержит какие-либо обнаруживаемые фрагменты альфа-Gal.

[0172] В конкретных вариантах осуществления чПМ слитый белок к TNF α имеет растворимую внеклеточную часть домена TNFR1, слитую с доменом Fc с аминокислотными последовательностями ESY606, как показано на Фиг. 2В (сайты гликозилирования по аспарагину (N), неконсенсусные сайты гликозилирования по аспарагину (N); указаны в легенде) имеет гликозилирование, в частности 2,6-сиалирование, в одном или более положениях аминокислот, как указано на Фиг. 2В, включая N54, N94 или N145 домена TNFR1 (SEQ ID NO: 1) и/или N294 или N358 домена Fc (SEQ ID NO: 12) и/или сайты O-связанного гликозилирования в одном или более аминокислотных положениях T8, T184, S199 и/или T200 домена TNFR2 (SEQ ID NO: 1) и/или T245 шарнирной области (SEQ ID NO: 12). В других вариантах осуществления чПМ слитый белок к TNF α не содержит какие-

либо обнаруживаемые фрагменты NeuGc и/или не содержит какие-либо обнаруживаемые фрагменты альфа-Gal.

[0173] В определенных вариантах осуществления чПМ Fc-слитый белок к TNF α является терапевтически эффективным и по меньшей мере на 0,5%, 1% или 2% гликозилированным и/или сульфатированным и может быть гликозилирован и/или сульфатирован по меньшей мере на 5%, 10% или даже на 50% или 100%. Целью генной терапии, представленной в данном документе, является замедление или остановка прогрессирования или облегчение одного или более симптомов неинфекционного увеита, например, снижение уровня боли, покраснения глаз, чувствительности к свету и/или другого дискомфорта у пациента. Эффективность можно контролировать, измеряя уменьшение боли, покраснения глаз и/или светобоязни и/или улучшения зрения.

[0174] Комбинации доставки чПМ Fc-слитого белка к TNF α в глаз в с доставкой других доступных средств для лечения охватываются способами, предложенными в данном документе. Дополнительные средства для лечения можно вводить до, одновременно, или после генной терапии. Доступные средства для лечения субъекта с неинфекционным увеитом, которые можно комбинировать с генной терапией, предложенной в данном документе, включают, помимо прочего, азатиоприн, метотрексат, микофенолятмофетил, циклоспорин, циклофосфамид, кортикостероиды (местные и/или системные) и другие, и введение с агентами к TNF α , включая, помимо прочего, этанерцепт, EYS606, адалимумаб, инфликсимаб или голимумаб.

ТАБЛИЦА 6. Аминокислотные последовательности Fc-слитых белков к TNF α

Домен	SEQ ID NO:	Последовательность
TNFR1 <i>Внеклеточный домен TNFRSF1A человека, UniProtKB - аминокислоты 1-211 P19438</i>	SEQ ID NO: 1	MGLSTVPDLLLPLVLELLVGIYPSGVIGLVPHLGDR EKRDSVCPQGKYIHPQNNSICCTKCHKGTLYNDCP GPGQDTCRECESGSFTAENHLRHCLSCSKCRKEM GQVEISSCTVDRDTCVCGCRKNQYRHYWSENLFQCF NCSLCLNGTVHLSCQEKQNTVCTCHAGFFLRENECV SCSNCKKSLECTKLCLPQIENVKGTEDSGTT
TNFR2 <i>Внеклеточный домен TNFRSF1B человека, UniProtKB - аминокислоты 23-257 P20333</i>	SEQ ID NO: 2	LPAQVAFTPY APEPGSTCRL REYYDQTAQM CCSKCSPGQH AKVFCTKTS D TVCDSCEDST YTQLWNWVPE CLSCGSRCSS DQVETQACTR EQNRICTRP GWYCALSQKQE GCRLCAPLRK CRPGFGVARP GTETSDVVCK PCAPGTFSTNT TSSTDICRPH QICNVVAIPG NASMDAVCTS TSPTRSMAPG AVHLPQPVST RSQHTQPTPE PSTAPSTSFL LPMGPSPPAE GSTGD
Этанерцепт: Fc (включая шарнир)	SEQ ID NO:3	<i>EPKSCDKTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP</i> KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWFYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTP PVLDSDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNNH YTQKSLSLSP GK
Этанерцепт: Fc (без шарнира)	SEQ ID NO: 4	FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK

Домен	SEQ ID NO:	Последовательность
		NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLD DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK
Этанерцепт: шарнирная область	SEQ ID NO: 5	EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV
EYS606: Fc (включая шарнир)	SEQ ID NO: 6	<i>DKTHTCPPCPAPELLGGPSV</i> FLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLD SDGS
EYS606: Fc (без шарнира)	SEQ ID NO: 7	FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTPPVLDSDGS
EYS606: сайт расщепления тромбином	SEQ ID NO: 8	LVPRGS
EYS606: Шарнирная область	SEQ ID NO: 9	DKTHTCPPCPAPELLGGPSV
Слитый белок TNFR2:Fc Этанерцепт	SEQ ID NO: 10	LPAQVAFTPY APEPGSTCRL REYYDQTAQM CCSKCSPGQH AKVFCTKTS D TVCDSCEDST YTQLWNWVPE CLSCGSRCSS DQVETQACTR EQNRICTCRP GWYCALSKQE GCRLCAPLRK CRPGFGVARP GTETSDVVCK PCAPGTFSTNT TSSTDICRPH QICNVVAIPG NASMDAVCTS TSPTRSMAPG AVHLPQPVST RSQHTQPTPE PSTAPSTSFL LPMGSPPAE GSTGDEPKSC <i>DKTHTCPPCP APELLGGPSV</i> FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE

Домен	SEQ ID NO:	Последовательность
		WESNGQPENN YKTPPVLD S DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK
Этанерцепт плюс лидерная последовательность	SEQ ID NO: 11	MYRMQLLLLI <u>ALSLALVTNSLPAQVAFTPYAPEPGSTCRLREY</u> <u>YDQTAQMCCSKCSPGQNAKVFCTKTSDTVCDSCEDSTYTQLW</u> <u>NWVPECLSCGSRCSSDQVETOACTREQNRICTCRPGWYCALSK</u> <u>QEGCRLCAPLRKCRPGFGVARPGTETSDVVCKPCAPGTFSNTTS</u> <u>STDICRPHOICNVVAIPGNASMDAVCTSTSPTRSMAPGAVHLPO</u> <u>PVSTRSQHTOPTPEPSTAPSTSFLPMGSPPAEGSTGDEPKSCD</u> <i>KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV</i> SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK Лидерная последовательность выделена жирным шрифтом. Домен TNFR подчеркнут. Шарнирная область выделена курсивом, а домен Fc выделен серым цветом.
EYS606	SEQ ID NO: 12	MGLSTVPDLLLPLVLELLVGIYPSGVIGLPHLGDREKRDSVC PQGKYIHPQNSICCTKCHKGTLYLNDCPGPGQDTCRECESG SFTASENHLRHCLSCSKCRKEMGQVEISSCTVDRDTVCGCRKN QYRHYWSENLFQCFNCSLCLNGTVHLSCQEKQNTVCTCHAGF FLRENECVSCSNCKKSLECTKLCLPQIENVKGTEDSGTT LVPRG <u>SKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV</u> DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGS Сайт расщепления тромбина выделен жирным шрифтом/подчеркнут. Шарнирная область выделена курсивом, а домен Fc выделен серым цветом.

ТАБЛИЦА 7. Нуклеотидные последовательности Fc-гибрида к TNF α

Белок	SEQ ID NO:	Последовательность
Этанерцепт	SEQ ID NO: 13	CTGCCTGCACAGGTGGCTTTTACCCCATATGCTCCTGAGCCTGGATCC ACTTGTAGGCTGAGGGAGTATTATGATCAGACAGCCAGATGTGCTG TTCAAATGTTCCCCTGGACAGCATGCTAAGGTGTTTGTACCAAGA CAAGTGACACTGTCTGTGACAGCTGTGAGGATTCTACTTACACCCAG CTGTGGAATTGGGTGCCAGAATGTCTGTCATGTGGGAGCAGGTGTC

Белок	SEQ ID NO:	Последовательность
		<p>TAGTGACCAGGTGGAAACTCAGGCCTGTACAAGAGAGCAGAACAGG ATTTGTACATGTAGACCAGGGTGGTACTGTGCCCTGAGCAAACAGGA AGGGTGTAGGCTCTGTGCTCCCTGAGGAAATGTAGACCTGGGTTTG GGGTGGCCAGACCAGGAACAGAAACTTCTGATGTGGTCTGTAAGCCC TGTGCACCAGGAACCTTTTCAAACACTACCAGCAGTACAGACATCTG CAGACCCCATCAGATCTGTAATGTGGTGGCCATTCCTGGGAATGCAA GTATGGATGCTGTCTGTACTTCCACCAGCCCACTAGATCCATGGCCC CAGGGCAGTCCACCTGCCCCAGCCTGTCAGCACTAGAAGCCAGCAT ACTCAGCCCACACCTGAGCCTTCTACAGCACCCCTCCACCTCTTTCCTG CTGCCTATGGGGCCATCACCTCCAGCTGAGGGCAGTACAGGGGATGA <i>ACCTAAGTCATGTGACAAAACCCATACCTGTCCACCTGCCCTGCTCCTGA</i> <i>GCTGCTGGGGGACCCAGTGTCTTCCTGTTTCCTCCAAACCTAAAGA</i> TACTCTGATGATCAGCAGAACCCAGAGGTACATGCGTGGTAGTGG ATGTCTCCCATGAAGACCTGAAGTGAAGTTTAATTGGTATGTAGAT GGGGTGGAGGTCCATAATGCAAAGACCAAGCCCAGGGAAGAACAGT ATAACAGTACTTACAGGGTGGTGTCTGTGCTGACAGTACTGCACCAG GACTGGCTGAATGGGAAGGAGTATAAGTCAAAGTCAGCAATAAGG CACTGCCTGCCCTATTGAAAAGACAATTAGTAAAGCTAAGGGGCAG CCCAGGGAACCACAGGTCTACACTCTGCCCCCTAGTAGAGAGGAAAT GACAAAGAATCAGGTCACTGTGACATGTCTGGTCAAGGGATTCTATC CAAGTGATATTGCAGTGGAGTGGGAAAGTAATGGCCAGCCAGAGAA TAACTACAAGACTACCCCCCAGTGTGGACAGTGTGGATCTTTCTT TCTGTACTCCAAACTGACTGTGGATAAATCAAGATGGCAGCAGGGCA ATGTCTTTTCCTGTTCAGTCATGCATGAAGCCCTGCATAATCACTACA CTCAGAAGAGCCTGTCCCTGTCCCTGGCAAATGA</p> <p>Домен TNFR2 выделен серым цветом. Область шарнира выделена курсивом.</p>
Этанерцепт плюс лидерная последовательность	SEQ ID NO: 14	<p>ATGTATAGGATGCAGCTGCTGCTGCTGATTGCTCTGAGTCTGGCT CTGGTCACAAATAGTCTGCCTGCACAGGTGGCTTTTACCCCATATGC TCCTGAGCCTGGATCCACTTGTAGGCTGAGGGAGTATTATGATCAGA CAGCCCAGATGTGCTGTTCAAATGTTCCCTGGACAGCATGCTAAG GTGTTTTGTACCAAGACAAGTGACACTGTCTGTGACAGCTGTGAGGA TTCTACTTACACCCAGCTGTGGAATTGGGTGCCAGAATGTCTGTCTATG TGGGAGCAGGTGTTCTAGTGACCAGGTGGAAACTCAGGCCTGTACAA GAGAGCAGAACAGGATTTGTACATGTAGACCAGGGTGGTACTGTGCC CTGAGCAAACAGGAAGGGTGTAGGCTCTGTGCTCCCCTGAGGAAATG TAGACCTGGGTTTGGGGTGGCCAGACCAGGAACAGAACTTCTGATG TGGTCTGTAAGCCCTGTGCACCAGGAACCTTTTCAAACACTACCAGC AGTACAGACATCTGCAGACCCCATCAGATCTGTAATGTGGTGGCCAT TCCTGGGAATGCAAGTATGGATGCTGTCTGTACTTCCACCAGCCCAA CTAGATCCATGGCCCCAGGGCAGTCCACCTGCCCCAGCCTGTGAGC ACTAGAAGCCAGCATACTCAGCCCACACCTGAGCCTTCTACAGCACC CTCCACCTCTTTCCTGCTGCCTATGGGGCCATCACCTCCAGCTGAGGG CAGTACAGGGGATGAACCTAAGTCATGTGACAAAACCCATACCTGTG CACCTGCCCTGCTCCTGAGCTGCTGGGGGACCCAGTGTCTTCCTGT</p>

Белок	SEQ ID NO:	Последовательность
		<p>TTCCTCCCAAACCTAAAGATACTCTGATGATCAGCAGAACCCAGAG GTCACATGCGTGGTAGTGGATGTCTCCCATGAAGACCCTGAAGTGAA GTTTAATTGGTATGTAGATGGGGTGGAGGTCCATAATGCAAAGACCA AGCCCAGGGAAGAACAGTATAACAGTACTTACAGGGTGGTGTCTGTG CTGACAGTACTGCACCAGGACTGGCTGAATGGGAAGGAGTATAAGT GCAAAGTCAGCAATAAGGCACTGCCTGCCCTATTGAAAAGACAATT AGTAAAGCTAAGGGCAGCCCAGGGAACCACAGGTCTACACTCTGC CCCCTAGTAGAGAGGAAATGACAAAGAATCAGGTCACTGACATGT CTGGTCAAGGGATTCTATCCAAGTGATATTGCAGTGGAGTGGGAAAG TAATGGCCAGCCAGAGAATAACTACAAGACTACCCCCCAGTGCTGG ACAGTGATGGATCTTTCTTTCTGTACTCCAAACTGACTGTGGATAAAT CAAGATGGCAGCAGGGCAATGTCTTTTCTGTTCACTCATGCATGAA GCCCTGCATAATCACTACACTCAGAAGAGCCTGTCCCTGTCCCCTGG CAAATGA</p> <p>Последовательность лидеров выделена жирным шрифтом</p>
<p>рAAV.CAG. Этанерцепт (от 5'-ITR к 3'-ITR)</p>	<p>SEQ ID NO:15</p>	<p>ctgcgcctcgtcgtcactgagccgcccgcaagccccggcgtcggcgaccttggcgcgccgcctc agtgagcagcgagcgcgagagaggagtgcccaactccatcactagggttctttagttaatgattaacc gcatgctacttaccaggtaatgggatcctctagaactatagctagcagacattgatttactagtattaat agtaatcaattacggggtcattagtcagccatataatgaggtccgcgttacataactacgtaaatggccgcc tggctgaccgccaacgacccccgccattgacgtcaataatgacgtatgtccatagtaacgcaataggactt tccattgacgtcaatgggtggagtattacggtaaactgccacttggcagfacatcaagtgtatcatatgccaagtac gccccctattgacgtcaatgacggtaaatggccgcctggcattatgccagtacatgacctatggactttctac ttggcagtcacatctacgtattgacgcctattaccatggtcaggtgagccccacgttctgcttacttccccatct ccccccctcccccccccaattttagtatttatttttaattttttagtgcagcgatggggcgggggggggggg gggcgcgccagggcgggcgggcgggcgagggcgggcgggcgagggcgagggcgagggcgagggcgagggcg cagccaatcagagcgcgctccgaaagtctttagtgcgagggcgggcgggcgagggcgagggcgagggcgagggcg cgaagcgcgggcgggcggggagtcgctgcgcgctgccttcgccccgtccccgcctccgccgccctcgcgc cggccgccccggcctgactgaccggttactcccacaggtgagcgggcgggacggcccttctctccggcgtgt aattagcgttggtttaatgacggctgtttctttctgtgctgcgtgaaagccttgagggctccggagggccctt tgtcgggggagcggcctcgggggtcgtgctgtgtgtgtgctggtgggagcgccgctgctgctccgcgct gccccggcgtgtgagcgtcggggcgggcggggcttgtgctccgaggtgctgctgaggggagggagcgc ggccggggcggtgccccgcgtgctgggggggctgagggggaacaaagctgctgctgctgggtgtgtgct gtgggggggtgagcaggggtgtggcgctgctgctgctgctgcaacccccctgacccccctccccaggtg ctgagcacggccggcttcgggtgctgggctccgtacgggctggcggggctcggctgcccggggcgggg gggtggcgaggtgggggtccggcgggcgggcgcccgccggggagggctcggggagggg cgcgcgccccggagcggcggtgctgagggcgggcgagccgagccattgcttttagttaatcgtg cgagagggcgagggactccttgtcccaaatctgtgcgagccgaaactgggagggcgccgccgacccccct ctagggcgcgggggcgaagcgggtcggcgccggcaggaaggaatgggggggagggccttctgctgctg ccgccccggccttctccctcaccgctcgggctgtccgggggggacggctgcttccggggggagc gggcagggcggggttcgcttctgctgctgacggcggtcttagagccttcttaacatgttcatgcttctt ttctacagctcctggcaactgctggttattgtgctgctcatatttggcaagAATTCGCCACCAT GTATAGGATGCAGCTGCTGCTGCTGATTGCTCTGAGTCTGGCTCTGGT CACAAATAGTCTGCCTGCACAGGTGGCTTTTACCCCATATGCTCCTGA GCCTGGATCCAATTGTAGGCTGAGGGAGTATTATGATCAGACAGCCC</p>

Белок	SEQ ID NO:	Последовательность
		AGATGTGCTGTTCAAAATGTTCCCCTGGACAGCATGCTAAGGTGTTTT GTACCAAGACAAGTGACACTGTCTGTGACAGCTGTGAGGATTCTACT TACACCCAGCTGTGGAATTGGGTGCCAGAATGTCTGTCATGTGGGAG CAGGTGTTCTAGTGACCAGGTGGAAACTCAGGCCTGTACAAGAGAGC AGAACAGGATTTGTACATGTAGACCAGGGTGGTACTGTGCCCTGAGC AAACAGGAAGGGTGTAGGCTCTGTGCTCCCCTGAGGAAATGTAGACC TGGGTTTGGGGTGGCCAGACCAGGAACAGAACTTCTGATGTGGTCT GTAAGCCCTGTGCACCAGGAACCTTTTCAAACACTACCAGCAGTACA GACATCTGCAGACCCCATCAGATCTGTAATGTGGTGGCCATTCTGG GAATGCAAGTATGGATGCTGTCTGTACTTCCACCAGCCCACTAGAT CCATGGCCCCAGGGCAGTCCACCTGCCCCAGCCTGTCAGCACTAGA AGCCAGCATACTCAGCCACACCTGAGCCTTCTACAGCACCCCTCCAC CTCTTTCCTGCTGCCTATGGGGCCATCACCTCCAGCTGAGGGCAGTAC AGGGGATGAACCTAAGTCATGTGACAAAACCCATACCTGTCCACCCT GCCCTGCTCCTGAGCTGCTGGGGGGACCCAGTGTCTTCTGTTTCCTC CCAAACCTAAAGATACTCTGATGATCAGCAGAACCCAGAGGTCACA TGCGTGGTAGTGGATGTCTCCCATGAAGACCCTGAAGTGAAGTTTAA TTGGTATGTAGATGGGGTGGAGGTCCATAATGCAAAGACCAAGCCCA GGGAAGAACAGTATAACAGTACTTACAGGGTGGTGTCTGTGCTGACA GTACTGCACCAGGACTGGCTGAATGGGAAGGAGTATAAGTGAAAG TCAGCAATAAGGCACTGCCTGCCCTATTGAAAAGACAATTAGTAAA GCTAAGGGGCAGCCAGGGAACCCACAGGTCTACACTCTGCCCCCTAG TAGAGAGGAAATGACAAAGAATCAGGTCAGTCTGACATGTCTGGTCA AGGGATTCTATCCAAGTGTATTGCAGTGGAGTGGGAAAGTAATGGC CAGCCAGAGAATAACTACAAGACTACCCCCCAGTGCTGGACAGTGA TGGATCTTCTTCTGTACTCCAACTGACTGTGGATAAATCAAGATG GCAGCAGGGCAATGTCTTTTCTGTTTCAGTCATGCATGAAGCCCTGC ATAATCACTACACTCAGAAGAGCCTGTCCCCTGTCCCCTGGCAAATGA TAACTcgaggacgggtgaactacgcctgaggatccgatctttccctcgccaaaattatggggacatcatg aagcccttgagcatctgactctggtaataaaggaaatttttcaatgcaatagtggtggaatttttctgctctc actcgaagcaattcgtgatcgaattcgaccaccataataaccattaccctgtagataagtagatggcggt taatcattaactacaaggaaccctagtgatggagtggccaciccctctcgcgcgctcgcctcactgaggcc ggcgaccaaaaggtcgcccgacggcggttggcgggcgccctcagtgagcgcgagcgcgcag
<p>рAAV.CAG. Этанерцепт</p> <p><i>(от промотора к поли(A))</i></p>	SEQ ID NO: 16	acattgattattgactagtattataatagtaataaattacggggtcattagttcatagcccatataggagtccgcgttaca taacttacgtaaatggcccctggctgaccgccaacgacccccgccattgacgcaataatgacgtatgtcc catagtaacccaataggacttccattgacgtcaatgggtggagtatttacgtaaaactgcccacttggcagtaca tcaagtgtatcatatgccaaagtacccccctattgacgtcaatgacgtaaatgccccgctggcattatgccagta catgacctatgggacttctacttggcagtacatctacgtattagtcacgctattaccatggctgaggtgagcccca cgttctgctcactctccccatcccccccccccccccccaatttgtattatttttaattttttgtgcagcgat gggggccccggggggggggggggcgcgccagcgggggcgggggcgaggggcgggggcgggg gagggcgagaggtgcgggcgagccaatcagagcggcgctccgaaatttctttatggcgagcgcgcg cggcgcgccctataaaaagcgaagcgcgcgggcgggagtcgctgcgcgctgcctcgcctcgcctcgcctc cgctccgccccgctcgcgccccgccccggctctgactgaccgcttactcccacaggtgagcggggcg acggcccttctcctccggctgtaattagcgcttggtttaatgacggcttcttcttctgtggctcgtgaaagccttg

Белок	SEQ ID NO:	Последовательность
		<p> aggggctccggaggcccttgtgctggggggagcggctcgggggtgctgctgctgtgtgctgctggggag ccccgcgtgcgctccgcctgcccggcgctgtgagcgtgctggggcgcggcgcggggcttgtgctccgc agtgtgctgagggggagcgcgccggggcggtgccccgcggtgctggggggggctgctgaggggaacaaa ggctgctgctgggggtgtgtgctgggggggtgagcagggggtgtggcgctgctggctgcaaccccc ctgacccccctccccgagttgctgagcacggcccggctcgggtgctggggctccgtacggggctggcgcg ggctcggcgtgcccggcgggggtggcgaggtgggggtgccggcgggcgggcgccctggggcg gggagggtcgggggagggcgcgggcggccccggagcggcgggctgtgagggcgggcgagccgca gccattgcctttatgtaatcgtgctgagaggcgagggacttcttgcacaaatctgtgaggagccgaatctg ggaggcggcggcaccctctagcggcgcgggcggaagcgtgctggcgccggcaggaagaaatggg cggggaggccttctgctgctgcccggcggcgtccccttctccctctccagcctcggggctgcccggggg acggctgcttccggggggacggcgagggcggggttcgcttctgctgtgaccggcggtctagagcctt gctaaccatgtcatccttcttcttctacagctcctgggcaactgctggttattgtgctgtctcatctttgcaa agAATTCGCCACCATGTATAGGATGCAGCTGCTGCTGCTGATTGCTCT GAGTCTGGCTCTGGTCACAAATAGTCTGCCTGCACAGGTGGCTTTTAC CCCATATGCTCCTGAGCCTGGATCCACTTGTAGGCTGAGGGAGTATT ATGATCAGACAGCCCAGATGTGCTGTTCAAATGTTCCCCTGGACAG CATGCTAAGGTGTTTTGTACCAAGACAAGTGACACTGTCTGTGACAG CTGTGAGGATTCTACTTACACCAGCTGTGGAATTGGGTGCCAGAAT GTCTGTATGTGGGAGCAGGTGTTCTAGTGACCAGGTGGAACTCAG GCCTGTACAAGAGAGCAGAACAGGATTTGTACATGTAGACCAGGGT GGTACTGTGCCCTGAGCAAACAGGAAGGGTGTAGGCTCTGTGCTCCC CTGAGGAAATGTAGACCTGGGTTTGGGGTGCCAGACCAGGAACAG AAATTCTGATGTGGTCTGTAAGCCCTGTGCACCAGGAACCTTTTCAA ACACTACCAGCAGTACAGACATCTGCAGACCCCATCAGATCTGTAAT GTGGTGGCCATTCCTGGGAATGCAAGTATGGATGCTGTCTGTACTTCC ACCAGCCCACTAGATCCATGGCCCCAGGGCAGTCCACCTGCCCA GCCTGTCAGCACTAGAAGCCAGCATACTCAGCCCACACCTGAGCCTT CTACAGCACCTCCACCTCTTTCTGCTGCCTATGGGGCCATCACCTC CAGCTGAGGGCAGTACAGGGGATGAACCTAAGTCATGTGACAAAAC CCATACCTGTCCACCCTGCCCTGCTCCTGAGCTGCTGGGGGGACCCA GTGTCTTCTGTTTCTCCCAAACCTAAAGATACTCTGATGATCAGCA GAACCCCAAGAGGTCACATGCGTGGTAGTGGATGTCTCCCATGAAGAC CCTGAAGTGAAGTTAATTGGTATGTAGATGGGGTGGAGGTCCATAA TGCAAAGACCAAGCCCAGGGAAGAACAGTATAACAGTACTTACAGG GTGGTGTCTGTGCTGACAGTACTGCACCAGGACTGGCTGAATGGGAA GGAGTATAAGTGCAAAGTCAGCAATAAGGCACTGCCTGCCCTATTG AAAAGACAATTAGTAAAGCTAAGGGGCAGCCCAGGGAACCACAGGT CTACACTCTGCCCCCTAGTAGAGAGGAAATGACAAAGAATCAGGTCA GTCTGACATGTCTGGTCAAGGGATTCTATCCAAGTATATTGCAGTG GAGTGGGAAAGTAATGGCCAGCCAGAGAATAACTACAAGACTACCC CCCCAGTGTGGACAGTGTGGATCTTCTTTCTGTACTCCAAACTGA CTGTGGATAAATCAAGATGGCAGCAGGGCAATGTCTTTTCTGTTCA GTCATGCATGAAGCCCTGCATAATCACTACACTCAGAAGAGCCTGTC CCTGTCCCCTGGCAAATGATAACtcgaggacggggtgaactacgctgaggatccgatcttt </p>

Белок	SEQ ID NO:	Последовательность
		tccctctgccaataattatggggacatcatgaagcccctgagcatctgacttctggcctaataaaggaattattttcattgcaatagtggttgaattttttgtgtctcactcg
<p>рAAV.sc.mU1a.Vh4i. Этанерцепт (от 5'-ITR к 3'-ITR) (2259 п.н.)</p>	<p>SEQ ID NO: 17</p>	<p>ctgcgctcgcctcgtcactgaggccgccgggcaagcccggcgctggcgacaccttggtcgccggcctc agtgagcgagcgagcgcgcagagaggagtggaattcaCGCGTATGGAGGCGGTACTATG TAGATGAGAATTCAGGAGCAAACCTGGGAAAAGCAACTGCTTCCAAA TATTTGTGATTTTACAGTGTAGTTTTGGAAAACTCTTAGCCTACCA ATTCTTCTAAGTGTTTTAAAATGTGGGAGCCAGTACACATGAAGTTAT AGAGTGTTTTAATGAGGCTTAAATATTTACCGTAACTATGAAATGCT ACGCATATCATGCTGTTTCAGGCTCCGTGGCCACGCAACTCATACTCA GGTGAGTATCTCAGGGATCCAGACATGGGGATATGGGAGGTGCCTCT GATCCCAGGGCTCACTGTGGGTCTCTGTTCACAGGTTAccggtGCCA CCATGTATAGGATGCAGCTGCTGCTGCTGATTGCTCTGAGTCTGGCTC TGGTCACAAATAGTCTGCCTGCACAGGTGGCTTTTACCCCATATGCTC CTGAGCCTGGATCCACTTGTAGGCTGAGGGAGTATTATGATCAGACA GCCCAGATGTGCTGTTCAAAATGTTCCCTGGACAGCATGCTAAGGT GTTTTGTACCAAGACAAGTGACACTGTCTGTGACAGCTGTGAGGATT CTACTTACACCCAGCTGTGGAATTGGGTGCCAGAATGTCTGTCATGT GGGAGCAGGTGTTCTAGTGACCAGGTGGAACTCAGGCCTGTACAAG AGAGCAGAACAGGATTTGTACATGTAGACCAGGGTGGTACTGTGCC TGAGCAAAACAGGAAGGGTGTAGGCTCTGTGCTCCCTGAGGAAATGT AGACCTGGGTTTGGGGTGGCCAGACCAGGAACAGAACTTCTGATGT GGTCTGTAAGCCCTGTGCACCAGGAACCTTTTCAAACACTACCAGCA GTACAGACATCTGCAGACCCCATCAGATCTGTAATGTGGTGGCCATT CCTGGGAATGCAAGTATGGATGCTGTCTGTACTTCCACCAGCCCAAC TAGATCCATGGCCCCAGGGCAGTCCACCTGCCCCAGCCTGTACAGA CTAGAAGCCAGCATACTCAGCCCACACCTGAGCCTTCTACAGCACCC TCCACCTCTTTCCTGCTGCCTATGGGGCCATCACCTCCAGCTGAGGGC AGTACAGGGGATGAACCTAAGTCATGTGACAAAACCCATACCTGTCC ACCCTGCCCTGCTCCTGAGCTGCTGGGGGACCCAGTGTCTTCTGTT TCCTCCCAAACCTAAAGATACTCTGATGATCAGCAGAACCCAGAGG TCACATGCGTGGTAGTGGATGTCTCCATGAAGACCCTGAAGTGAAG TTTAATTGGTATGTAGATGGGGTGGAGGTCCATAATGCAAAGACCAA GCCCAGGGAAGAACAGTATAACAGTACTTACAGGGTGGTGTCTGTGC TGACAGTACTGCACCAGGACTGGCTGAATGGGAAGGAGTATAAGTG CAAAGTCAGCAATAAGGCACTGCCTGCCCTATTGAAAAGACAATTA GTAAGCTAAGGGGCAGCCAGGGAACACAGGTCTACACTCTGCC CCTAGTAGAGAGGAAATGACAAAGAATCAGGTCACTGTGACATGTCT GGTCAAGGGATTCTATCCAAGTATATTGCAGTGGAGTGGGAAAGTA ATGGCCAGCCAGAGAATAACTACAAGACTACCCCCCAGTGTCTGGAC AGTGATGGATCTTTCTTTCTGTACTCCAACTGACTGTGGATAAATCA AGATGGCAGCAGGGCAATGTCTTTTCTGTTCACTCATGCATGAAGC CCTGCATAATCACTACACTCAGAAGAGCCTGTCCCTGTCCCTGGCA AATGATAAaagcttgatcttttccctctgccaataattatggggacatcatgaagcccctgagcatctgactt ctggcctaataaaggaattttttcattgcaatagtggttgaattttttgtgtctcactcggtagcgaagaattct</p>

Белок	SEQ ID NO:	Последовательность
		agcaggcatgctggggagagatcgalctgaggaaccctagtgatggagttggccactccctctctgcgcgctcg ctgctcactgaggccgcccgggcaagccccgggcgtcgggcgacctttggctgccccggcctcagtgagcgag cgagcgcgagagaggagtgggcaaa
<p>рAAV.sc.mU1a.Vh4i. Этанерцепт (от промотора к поли(А)) (1951 п.н.)</p>	<p>SEQ ID NO: 18</p>	ATGGAGGCGGTACTIONTGTAGATGAGAATTCAGGAGCAACTIONTGGGAA AAGCAACTGCTTCCAAATATTTGTGATTTTTACAGTGTAGTTTTGGAA AAACSTTAGCCTACCAATTCTTCTAAGTGTTTTAAAATGTGGGAGCC AGTACACATGAAGTTATAGAGTGTTTTAATGAGGCTTAAATATTTAC CGTAACTATGAAATGCTACGCATATCATGCTGTTCAGGCTCCGTGGC CACGCAACTCATACTCAGGTGAGTATCTCAGGGATCCAGACATGGGG ATATGGGAGGTGCCTCTGATCCCAGGGCTCACTGTGGGTCTCTCTGTT CACAGGTTAccggtGCCACCATGTATAGGATGCAGCTGCTGCTGCTGAT TGCTCTGAGTCTGGCTCTGGTCACAAATAGTCTGCCTGCACAGGTGG CTTTTACCCCATATGCTCCTGAGCCTGGATCCACTTGTAGGCTGAGGG AGTATTATGATCAGACAGCCAGATGTGCTGTTCAAATGTTCCCCT GGACAGCATGCTAAGGTGTTTTGTACCAAGACAAGTGACACTGTCTG TGACAGCTGTGAGGATTCTACTTACACCCAGCTGTGGAATTGGGTGC CAGAATGTCTGTCATGTGGGAGCAGGTGTTCTAGTGACCAGGTGGAA ACTCAGGCCTGTACAAGAGAGCAGAACAGGATTTGTACATGTAGACC AGGGTGGTACTGTGCCCTGAGCAAACAGGAAGGGTGTAGGCTCTGTG CTCCCCTGAGGAAATGTAGACCTGGGTTTGGGGTGGCCAGACCAGGA ACAGAAACTTCTGATGTGGTCTGTAAGCCCTGTGCACCAGGAACCTT TTCAAACACTACCAGCAGTACAGACATCTGCAGACCCCATCAGATCT GTAATGTGGTGGCCATTCTGGGAATGCAAGTATGGATGCTGTCTGT ACTTCCACCAGCCCACTAGATCCATGGCCCCAGGGCAGTCCACCT GCCCCAGCCTGTCAGCACTAGAAGCCAGCATACTCAGCCCACACCTG AGCCTTCTACAGCACCTCCACCTCTTTCCTGCTGCCTATGGGGCCAT CACCTCCAGCTGAGGGCAGTACAGGGGATGAACCTAAGTCATGTGAC AAAACCCATACCTGTCCACCTGCCCTGCTCCTGAGCTGCTGGGGGG ACCCAGTGTCTTCTGTTTCTCCCAAACCTAAAGATACTCTGATGAT CAGCAGAACCCAGAGGTACATGCGTGGTAGTGGATGCTCCCCATG AAGACCCTGAAGTGAAGTTTAATTGGTATGTAGATGGGGTGGAGGTC CATAATGCAAAGACCAAGCCAGGGAAGAACAGTATAACAGTACTT ACAGGGTGGTGTCTGTGCTGACAGTACTGCACCAGGACTGGCTGAAT GGGAAAGAGTATAAGTGCAAAGTCAGCAATAAGGCACTGCCTGCC CTATTGAAAAGACAATTAGTAAAGCTAAGGGGCAGCCAGGGAACC ACAGGTCTACACTCTGCCCCCTAGTAGAGAGGAAATGACAAAGAATC AGGTCACTGACATGTCTGGTCAAGGGATTCTATCCAAGTGATATT GCAGTGGAGTGGGAAAGTAATGGCCAGCCAGAGAATAACTACAAGA CTACCCCCCAGTGTGGACAGTGTGGATCTTCTTCTGTACTCCA AACTGACTGTGGATAAATCAAGATGGCAGCAGGGCAATGTCTTTTCC TGTTCACTCATGCATGAAGCCCTGCATAATCACTACACTCAGAAGAG CCTGTCCCTGTCCCTGGCAAATGATAAaagctgatcttttccctctgcaaaaattatg gggacatcatgaagcccctgagcatctgactctgctaataaaggaaattttttcattgcaatagtgttgaatt tttgtgtctcactcg

5.6 Введение дозы Fc-слитых белков к TNF α

[0175] Терапевтически эффективные дозы любого такого рекомбинантного вектора следует вводить любым способом, чтобы рекомбинантный вектор проникал в клетки ткани глаза (например, клетки сетчатки), например, путем введения рекомбинантного вектора в кровотоки. Альтернативно, вектор можно вводить непосредственно в глаз, например, путем субретинальной, интравитреальной, интракамеральной, супрахориоидальной инъекции. В конкретных вариантах осуществления вектор вводят субретинально, интравитреально, интракамерально, супрахориоидально, подкожно, внутримышечно или внутривенно. Субретинальное, интравитреальное, интракамеральное, или супрахориоидальное введение должно приводить к экспрессии растворимого продукта трансгена в одном или более из следующих типов клеток сетчатки: фоторецепторные клетки человека (колбочки, палочки); горизонтальные клетки; биполярные клетки; амакриновые клетки; ганглиозные клетки сетчатки (карликовая клетка, зонтичная клетка, бистратифицированная клетка, гигантские ганглиозные клетки сетчатки, светочувствительные ганглиозная клетка и мюллеровская глия); и клетки пигментного эпителия сетчатки или другие клетки ткани глаза: клетки роговицы, клетки радужной оболочки, клетки цилиарного тела, клетки шлеммова канала, клетки трабекулярной сети, клетки ткани ПЭС-хориоидеи или клетки зрительного нерва.

[0176] Экспрессия трансгенного продукта приводит к доставке и сохранению трансгенного продукта в одной или более тканях глаза или типах клеток ткани глаза, например, клетки сетчатки. Фармацевтические композиции, подходящие для введения, содержат суспензию рекомбинантного вектора, содержащего трансген, кодирующий Fc-слитый белок к TNF α , в буфере для состава, содержащем физиологически совместимый водный буфер. Буфер для состава может содержать один или более из полисахаридов, поверхностно-активных веществ, полимеров или масел.

[0177] Альтернативно, вектор, кодирующий рекомбинантный вектор, кодирующий Fc-слитый белок к TNF α , доставляется в печень, и Fc-слитый белок к TNF α экспрессируется и секретируется в кровотоки. В конкретных вариантах осуществления дозы и пути введения вектора, содержащего трансген, кодирующий Fc-слитый белок этанерцепт, должны приводить к экспрессии Fc-слитого белка этанерцепта, которые обеспечивают достижение и поддержание интравитреальной концентрации слитого белка этанерцепта на уровне, эквивалентном интравитреальной концентрации, достигаемой ежемесячными инъекциями этанерцепта (Amgen) в дозе 40 мг.

5.7 Мониторинг эффективности

[0178] Композиции и способы, описанные в данном документе, могут быть оценены на эффективность с использованием любого способа оценки эффективности при лечении, предотвращении или облегчении НУ. Оценку можно проводить на животных моделях или с участием людей. Эффективность при дефиците зрения может быть измерена по остроте зрения с максимальной коррекцией (BCVA), например, путем оценки увеличения количества различимых букв или строк, где эффективность может быть оценена как у увеличение более или равное 2 строкам ETDRS или увеличение в logMAR, по снижению воспалительной активности передней и задней камеры по классификации SUN и/или по снижению степени помутнения стекловидного тела. Физические изменения глаза могут быть измерены с помощью оптической когерентной томографии с использованием методов, известных в данной области техники.

[0179] Композиции и способы, описанные в данном документе, могут быть оценены на эффективность с использованием любого способа оценки эффективности при лечении, предотвращении или облегчении НУ. Оценку можно проводить на животных моделях или с участием людей. Эффективность при дефиците зрения может быть измерена по остроте зрения с максимальной коррекцией (BCVA), например, путем оценки увеличения количества различимых букв или строк, где эффективность может быть оценена как у увеличение более или равное 2 строкам ETDRS или увеличение в logMAR, по снижению воспалительной активности передней и задней камеры по классификации SUN и/или по снижению степени помутнения стекловидного тела. Физические изменения глаза могут быть измерены с помощью оптической когерентной томографии с использованием методов, известных в данной области техники. Эффективность можно дополнительно контролировать путем определения частоты обострений и/или рецидивов, оценки клеток передней камеры, клеток стекловидного тела и степени помутнения стекловидного тела (например, степень $\leq 0,5+$) и/или количества активных поражений сетчатки или хориоидеи (воспалительных) (например, см. Kim J.S. et al, *Int Ophthalmol Clin.* 2015 Summer; 55(3): 79–110 или Rosenbaum J.T. et al *Volume 49, Issue 3, December 2019, Pages 438-445*; которые полностью включены в данный документ посредством ссылки).

[0180] Конечные точки могут включать, помимо прочего, среднее изменение степени помутнения стекловидного тела в исследуемом глазу по сравнению с исходным уровнем до 12, 16, 20, 24 или 28 недель или на момент восстановления, если ранее, доля пациентов, ответивших на лечение, без рецидива активного промежуточного, заднего или панuveита в исследуемом глазу через 12, 16, 20, 24 или 28 недель, среднее изменение остроты зрения с максимальной коррекцией от исходного уровня до 12, 16, 20, 24 или 28 недель, изменение от исходного уровня качества жизни/результатов лечения по оценке

пациента, среднее изменение степени помутнения стекловидного тела и оценку количества иммунных клеток в передней камере от исходного уровня до 12, 16, 20, 24 или 28 недель или изменение оценки терапии иммунодепрессантами от исходного уровня до 12, 16, 20, 24 или 28 недель.

6. ПРИМЕРЫ

6.1 ПРИМЕР 1: Вектор на основе кДНК этанерцепта

[0181] Был сконструирован вектор на основе кДНК этанерцепта, содержащий трансген, включающий нуклеотидные последовательности, кодирующие слитый белок TNFR:Fc этанерцепт (аминокислотные последовательности представляют собой SEQ ID NO: 10 или 11). Нуклеотидные последовательности представляют собой нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 13 или 14. Трансген также включает нуклеотидные последовательности, которые кодируют сигнальный пептид, например, MYRMQLLLLIALLSLALVTNS (SEQ ID NO: 62). См. Фиг. 2А для аминокислотной последовательности продукта трансгена. Вектор дополнительно включает конститутивный промотор, такой как CAG и mU1a, и может включать альтернативные промоторы, такие как EF1a, или CB7, или CB (SEQ ID NO: 159), или CB long (SEQ ID NO: 160), или тканеспецифический промотор, такой как тканеспецифический промотор глаза, в частности промотор GRK1 (SEQ ID NO: 54), или промотор Best1/GRK (SEQ ID NO: 161), или индуцируемый промотор, такой как индуцируемый гипоксией промотор.

6.2 ПРИМЕР 2. Вектор на основе кДНК EYS060

[0182] Конструируют вектор на основе кДНК EYS060, содержащий трансген, содержащий нуклеотидные последовательности, кодирующие слитый белок TNFR:Fc EYS060 (аминокислотные последовательности имеют SEQ ID NO: 12). Трансген также содержит нуклеотидные последовательности, кодирующие сигнальный пептид, например, MYRMQLLLLIALLSLALVTNS (SEQ ID NO:62). См. фиг. 2В для аминокислотной последовательности продукта трансгена. Вектор дополнительно включает конститутивный промотор, такой как CAG, mU1a, и может включать альтернативные промоторы, такие как EF1a, или CB7, или CB (SEQ ID NO: 159) или промотор CB long (SEQ ID NO: 160), или тканеспецифический промотор, такой как тканеспецифический промотор глаза, в частности, промотор GRK1 (SEQ ID NO:54) или промотор Best1/GRK (SEQ ID NO: 161), или индуцируемый промотор, такой как индуцируемый гипоксией промотор.

6.3 ПРИМЕР 3: Связывание TNF α у модельных видов с векторизованными IgG и Fab адалимумаба и векторизованным этанерцептом

[0183] А. Векторизованные кандидаты адалимумаба, выделенные из модельных видов, включая человека, мышь и крысу, тестировали на их связывающую способность в

отношении TNF α . Векторизованные антитела экспрессировали и секретируют в клеточный супернатант после трансфекции цис-плазмидой в клетки 293T. Супернатант клеток тестировали с помощью ИФА, при котором планшеты были покрыты рекомбинантным TNF α , полученным от вышеупомянутых видов (Фиг. 5А). IgG адалимумаб эффективно связывает TNF α человека и мыши. Fab демонстрирует профиль связывания с человеческим TNF α , аналогичный профилю связывания IgG. Однако Fab демонстрирует слабое связывание с мышинным TNF α по сравнению с IgG адалимумабом. Как IgG, так и Fab обнаруживают гораздо меньшее связывание с TNF α крысы.

[0184] В. Векторизованный этанерцепт таким же образом анализировали на связывание с TNF α человека, мыши и крысы. Этанерцепт связывал все TNF α человека, мыши и крысы и связывал TNF α крысы лучше, чем адалимумаб. См. Фиг. 5В

6.4 ПРИМЕР 4: Опосредованная AAV генная терапия при заболевании глаз, неинфекционном заднем увеите

[0185] Задний неинфекционный увеит является формой воспаления глаза, которая поражает сетчатку и сосудистую оболочку глаза и приводит к слепоте. Он поражает примерно 38000 американцев в год. Пациентов, как правило, лечат системными стероидами или кортикостероидами, что приводит к высокому риску системных осложнений. В 2016 году Хумира (адалимумаб), человеческое моноклональное антитело, нацеленное на фактор некроза опухоли альфа (TNF α), было одобрено FDA и стало единственным системным некортикостероидным средством для лечения неинфекционного увеита (НИУ) и с тех пор широко используется. В этом исследовании векторизованный Fc-слитый белок к TNF α , включая CAG.etanercept или mU1a.Vh4i.etanercept.scAAV, или векторизованный EYS606, а также AAV8.CAG.GFP, будет оцениваться на предмет опосредованной AAV экспрессии Fc-слитого белка к TNF α *in vivo* в тканях глаза мыши при местном введении. AAV8.NUL будет служить в качестве контрольного вектора. Также будут проведены исследования эффективности на модели ЭАИУ на грызунах для изучения терапевтического потенциала AAV-опосредованного лечения анти-TNF α для НИУ.

[0186] Векторизованные последовательности этанерцепта и EYS606 будут сконструированы и протестированы *in vitro*. Далее будут оцениваться эффективность трансдукции и специфичность к клеточному типу у мышей дикого типа. В этом исследовании будут использоваться молодые взрослые мыши линии C57BL/6 и B10.RIII (возраст 8-10 недель). Векторы, включающие CAG.etanercept (SEQ ID NO: 15 или 16 (с фланкирующими последовательностями ITR или без них)) или mU1a.Vh4i.etanercept.scAAV (SEQ ID NO: 17 или 18 (с фланкирующими последовательностями ITR или без них)), или векторизованный EYS606, а также AAV8.CAG.GFP и AAV8.NUL будут доставляться в глаза

мышей путем субретинальной (СР) инъекции в различных дозах (1×10^7 , 1×10^8 и 1×10^9 гв/глаз) в 1 мкл буфера для состава. Визуализация глазного дна и ОКТ будет выполнена через 1, 2 и 4 недели после субретинальной инъекции. Образцы глаз будут собраны через 5 недель после введения. Уровни экспрессии антител или слитого белка в тканях глаза будут количественно определены с помощью ИФА. Специфичность клеточного типа будет определяться при помощи иммунофлуоресцентного окрашивания различными маркерами клеток сетчатки. Для исследования эффективности будет выбран тестируемый вектор(-ы). Также будут изучены различные пути введения (ПВ), включая супрахориоидальные, интракамеральные и интравитреальные инъекции. Предпочтительный ПВ будет использоваться для исследования эффективности.

[0187] Исследования эффективности будут проводиться путем индукции экспериментального аутоиммунного увеита (ЭАИУ) у мышей линии B10.RIII путем иммунизации пептидом IRBP человека. Опосредованный Т-клетками аутоиммунный ответ в глазах будет возникать в этой модели с пиком примерно через 11-18 дней после индукции. Тестируемый вектор будет вводиться в глаз мыши через предпочтительный ПВ за 2 недели до или через 1 неделю после индукции ЭАИУ. В контралатеральный глаз будет доставлен вектор AAV.NUL, который будет использоваться в качестве контроля. Визуализация глазного дна и ОКТ, электроретинография (ЭРГ) и оптокинетический нистагм (ОКН) будут проведены/проверены через 10, 17 и 30 дней после индукции ЭАИУ для мониторинга прогресса заболевания. Ткани глаза или целые глазные яблоки будут собирать через 5 недель после индукции ЭАИУ. Уровни экспрессии слитого белка в тканях глаза будут обнаружены и количественно определены методом ИФА. Изменения структуры сетчатки и выживаемость нейронов будут оценивать с помощью гистологии и иммунофлуоресцентного окрашивания.

6.5 ПРИМЕР 5: Исследование *in vivo*

[0188] В этом исследовании полноразмерное антитело адалимумаб и антитело Fab адалимумаба в векторе на основе аденоассоциированного вируса (AAV) (AAV8.CAG.adalimumab.IgG (NIU001) и AAV8.CAG.adalimumab.Fab (NIU002)), а также Fc-слитый белок (AAV8.CAG.etanercept), будет оцениваться на AAV-опосредованную экспрессию антител *in vivo* в тканях глаза мыши при местном введении (субретинальном (СР), **таблица 8**).

Таблица 8: Схема исследования

Группа	Вектор	ПВ	Ввод. Объем (мкл)	Доза (гв/глаз)	N (животные)	N (глаза)
--------	--------	----	-------------------------	-------------------	-----------------	--------------

1	AAV8.CAG.Adalimumab.IgG	CP	1	1,00E+09	2	4
2		CP	1	1,00E+08	2	4
3	AAV8.CAG.Adalimumab.Fab	CP	1	1,00E+09	3	6
4		CP	1	1,00E+08	3	6
5	AAV8.CAG.Etanercept	CP	1	1,00E+09	3	6
6		CP	1	1,00E+08	3	6
7	Носитель	CP	1	1,00E+09	2	4

[0189] Векторизованные последовательности адалимумаба и этанерцепта были сконструированы и протестированы *in vitro*. Для этого исследования использовали молодых взрослых мышей B10.RIII (возраст 6-8 недель). Векторы, включающие AAV8.CAG.adalimumab.IgG, AAV8.CAG.adalimumab.Fab, AAV8.CAG.etanercept и носитель, доставляют в глаза мышей посредством субретинальной (CP) инъекции в двух различных дозах (1×10^8 и 1×10^9 гв/глаз) в 1 мкл буфера для состава (**таблица 8**).

[0190] Визуализацию глазного дна и ОКТ выполняли через 2 и 4 недели после субретинальной инъекции. Образцы глаз будут собирать через 4 недели после введения. Уровни экспрессии антител или слитого белка в тканях глаза количественно определяют с помощью ИФА. Специфичность клеточного типа определяли при помощи иммунофлуоресцентного окрашивания различными маркерами клеток сетчатки. Структурные изменения сетчатки и выживаемость нейронов оценивают с помощью гистологии и иммунофлуоресцентного окрашивания через 2 и 4 недели после введения.

6.6 ПРИМЕР 6: Оценка кинетики связывания этанерцепта, экспрессируемого вектором

[0191] Будет проведена оценка экспрессии и очистки векторизованного этанерцепта из AAV, полученного из цис-плазмид. Кинетику связывания очищенного векторизованного этанерцепта с белка TNF α разных видов будут сравнивать с коммерчески производимым этанерцептом в различных анализах связывания лиганда.

[0192] Аффинность связывания с использованием анализов Biacore™ (поверхностный плазмонный резонанс (ППР)). Исследование проводится для измерения аффинности связывания различных молекул TNF-альфа (TNF α) с очищенными TNFR-слитыми белками с использованием BiacoreT200. Во-первых, аффинность связывания TNF α с продуцируемым rAAV.CAG.Etanercept слитым белком сравнивают со связыванием TNF α с коммерческим этанерцептом. Во-вторых, проверяют аффинность связывания TNF α разных видов, чтобы определить пригодность белков TNF α различных видов для последующих исследований на животных моделях. Анализ Biacore проводят при 25°C с использованием HBS-EP+ в качестве рабочего буфера. Разбавленные слитые белки

захватываются сенсорным чипом с помощью метода захвата F_c (время захвата 15-20 минут). Белки $TNF\alpha$ различных видов (человека, макаки, свиньи, мыши, собаки, кролика и крысы) можно тестировать по отдельности в качестве аналита с последующей инъекцией рабочего буфера в фазе диссоциации. Рассчитывают скорость диссоциации [$K_{off} = K_d =$ скорость диссоциации белка; $K_{on} = K_a =$ скорость ассоциации белков; $K-D = K_{off}/K_{on}$], и меньшие (нижние) значения KD указывали на большую аффинность слитого белка $TNFR$ к его мишени.

Таблица 9. Схема проведения анализа

Лиганд	Аналит
Этанерцепт	$TNF\alpha$ человека
pAAV.CAG.Etanercept	$TNF\alpha$ человека
Этанерцепт	$TNF\alpha$ макака
pAAV.CAG.Etanercept	$TNF\alpha$ макака
Этанерцепт	$TNF\alpha$ свиньи
pAAV.CAG.Etanercept	$TNF\alpha$ свиньи
Этанерцепт	$TNF\alpha$ мыши
pAAV.CAG.Etanercept	$TNF\alpha$ мыши
Этанерцепт	$TNF\alpha$ собаки
pAAV.CAG.Etanercept	$TNF\alpha$ собаки
Этанерцепт	$TNF\alpha$ кролика
pAAV.CAG.Etanercept	$TNF\alpha$ кролика
Этанерцепт	$TNF\alpha$ крысы
pAAV.CAG.Etanercept	$TNF\alpha$ крысы

[0193] Аффинность связывания (KD) $TNF\alpha$ различных видов с векторизованным этанерцептом по сравнению с коммерческим этанерцептом будет ранжирована в соответствии с их значением KD .

6.7 Пример 7: Измерение эффекторной функции TNF -слитого белка

[0194] Эффекторные функции, антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность ($AZKЦ$) и комплементзависимая цитотоксичность ($KЗЦ$) этанерцепта, продуцируемого вектором, будут оцениваться с помощью анализов *in vitro* и сравниваться с

коммерчески производимым этанерцептом (ENBREL). Эффекторные функции проявляются через домен Fc антител и, таким образом, слитые белки, содержащие домен Fc, такие как этанерцепт.

Материалы и методы

[0195] Целевые клетки (CHO/DG44-tm TNF α ; GenScript, кат. № RD00746) поддерживают в соответствующей полной культуральной среде при 37°C с 5% CO₂. Эффекторные клетки (моноклеарные клетки периферической крови, PBMC; Saily Bio, кат. № XFB-HP100B) оттаивают при 37°C и поддерживают в полной культуральной среде 1640 при 37°C с 5% CO₂.

[0196] Для анализа доза-эффект АЗКЦ CHO/DG44-tm TNF α и PBMC можно использовать в качестве целевых клеток и эффекторных клеток, соответственно. При соотношении Е/Т (эффекторная клетка к целевой клетке), установленном на уровне 25:1, этанерцепт (коммерческий) и человеческий IgG1 против CHO/DG44-tm TNF α повторно использовали в качестве положительного и отрицательного контроля, соответственно.

Вкратце, стадии способа таковы:

CHO/DG44-tm TNF α (целевые клетки)

+

Образцы

+

PBMC (эффекторные клетки)

↓

% лизиса целевых клеток

[0197] Эффекторные клетки (PBMC) оттаивают и ресуспендируют в буфере для анализа (набор для обнаружения CellTiter-Glo® (Promega, кат. № G7573). Целевые клетки также размораживают и ресуспендируют в буфере для анализа АЗКЦ, затем переносят в суспензии на планшет для анализа в соответствии с картой планшета. Контрольные и тестируемые образцы в растворе также переносят на планшет для анализа, и планшет инкубируют при комнатной температуре в течение 30 минут. Плотность эффекторных клеток регулируют в соответствии с соотношением Е/Т, затем суспензию эффекторных клеток переносят на планшет для анализа. Планшет для анализа затем инкубируют в инкубаторе для клеток (37°C/5%CO₂) в течение 6 часов, извлекают, затем супернатант из соответствующих лунок планшета для анализа переносят в другой 96-луночный планшет для анализа. Смесь ЛДГ (набор LDH Cytotoxicity Detection Kit, Roche, кат. № 11644793001) переносят в соответствующие лунки второго 96-луночного планшета для анализа и

считывают люминесценцию/оптическую плотность с помощью планшет-ридера PHERAStar® (BMG LABTECH).

[0198] Для исследования доза-эффект КЗЦ в качестве целевой клетки можно использовать CHO/DG44-tm TNF α . Этанерцепт и IgG1 человека против CHO/DG44-tm TNF α с 5% NHSC (комплемент сыворотки здорового человека) можно использовать в качестве положительного и отрицательного контроля, соответственно. Вкратце, стадии способа анализа КЗЦ:

CHO/DG44-tm TNF α (целевые клетки)

+

Образцы

+

NHSC

↓

% лизиса целевых клеток

[0199] Целевые клетки собирают путем центрифугирования и ресуспендируют в буфере для анализа (CellTiter-Glo®Detection Kit (Promega, кат. № G7573). Образцы и контроли готовят в растворе с буфером для анализа КЗЦ. Плотность целевых клеток регулировали, а затем клеточную суспензию переносили на планшет для анализа. Контрольные и испытуемые образцы в рабочем растворе также переносят на планшет для анализа, а затем планшет для анализа инкубируют при комнатной температуре в течение 30 минут, после чего в планшет для анализа добавляют рабочий раствор комплемента сыворотки здорового человека (NHSC) (Quidel, кат. № A113). Планшет для анализа инкубируют в инкубаторе для клеток (37°C/5%CO₂) в течение 4 часов, извлекают и в соответствующие лунки добавляют рабочий раствор Cell Titer-Glo®, после чего планшет инкубируют в течение около 10-30 минут при комнатной температуре. Данные люминесценции считываются на планшет-ридере PHERAStar® FSX (BMG LABTECH) для определения количества жизнеспособных клеток. Необработанные данные по исследованию АЗКЦ и КЗЦ экспортируют из системы PHERAStar® FSX и анализируют с использованием программного обеспечения Microsoft Office Excel 2016 и GraphPad Prism 6. Формула % АЗКЦ-опосредованного лизиса целевых клеток = 100*(ОП образцы - ОП опухолевые клетки плюс эффекторные клетки) / (ОП максимальное высвобождение - ОП минимальное высвобождение). Формула % КЗЦ-опосредованного лизиса целевых клеток = 100*(1-(RLU образцы - RLU NHSC) / (RLU клетка+NHSC - RLU NHSC)). Относительные значения EC50 получают с использованием четырехпараметрической функции следующим образом, характеризующей сигмовидную кривую, на которой процент

лизиса целевых клеток зависит от концентрации тестируемых образцов: $Y = \text{Низ} + (\text{Верх} - \text{Низ}) / (1 + 10^{((\text{LogEC50} - X) * \text{угловой коэффициент Хилла}))} = \text{процент лизиса целевых клеток}$; и $X = \text{концентрация}$.

[0200] При соотношении Е/Т 25:1 клетки CHO/DG44-tm TNF α можно использовать в качестве целевых клеток в исследовании доза-эффект АЗКЦ. Рассчитывают доза-эффект и величины наилучшего согласия положительного контроля (коммерческий этанерцепт), образцов и отрицательного контроля (человеческий IgG1) (например, EC50).

[0201] С 5% NHSC, клетки CHO/DG44-tm TNF α используются в качестве целевых клеток в исследовании доза-эффект КЗЦ. Рассчитываются доза-эффект и величины наилучшего согласия положительного контроля (этанерцепт), образцов и отрицательного контроля (человеческий IgG1) (например, EC50).

[0202] Активность АЗКЦ и КЗЦ АAV-этанерцепта будет сравниваться с коммерческим этанерцептом. Не будучи связанными какой-либо одной теорией, различия могут наблюдаться из-за посттрансляционной модификации, такой как гликозилирование, которая, как ожидается, будет отличаться из-за получения коммерческого этанерцепта клеточной культурой.

ЭКВИВАЛЕНТЫ

[0203] Хотя изобретение подробно описано со ссылкой на его конкретные варианты осуществления, следует понимать, что варианты, которые являются функционально эквивалентными, находятся в пределах объема этого изобретения. Действительно, различные модификации изобретения в дополнение к тем, которые показаны и описаны в данном документе, станут очевидны специалистам в данной области техники из вышеприведенного описания и сопроводительных графических материалов. Предполагается, что такие модификации подпадают под объем прилагаемой формулы изобретения. Специалистам в данной области техники будет понятно или они смогут установить, применяя не более чем рутинные методы эксперимента, множество эквивалентов конкретных вариантов осуществления данного изобретения, описанных в данном документе. Предусмотрено, что такие эквиваленты охватываются следующими пунктами формулы изобретения.

[0204] Все публикации, патенты и заявки на патенты, упомянутые в данном описании, включены в данный документ посредством ссылки в той же мере, как если бы каждая отдельная публикация, патент или заявка на патент были специально и индивидуально указаны для включения в данный документ посредством ссылки во всей их полноте.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическая композиция для лечения неинфекционного увеита у субъекта-человека, нуждающегося в этом, содержащая вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV), имеющий:
 - (a) вирусный капсид, имеющий тропизм к клеткам ткани глаза; и
 - (b) искусственный геном, содержащий кассету экспрессии, фланкированную внутренними тандемными повторами (ITR) AAV, при этом кассета экспрессии содержит трансген, кодирующий Fc-слитый белок к TNF α , функционально связанный с одной или более регуляторными последовательностями, которые контролируют экспрессию трансгена в клетках глаза человека;
 при этом указанный вектор AAV составлен для субретинального, интравитреального, интраназального, интракамерального, супрахориоидального или системного введения указанному субъекту-человеку.
2. Фармацевтическая композиция по п. 1, отличающаяся тем, что Fc-слитый белок к TNF α содержит растворимую внеклеточную часть рецептора TNF α человека типа I (TNFR1) или типа II (TNFR2), ковалентно связанную пептидной связью с полипептидом, содержащим домен Fc тяжелой цепи иммуноглобулина.
3. Фармацевтическая композиция по п. 1 или п. 2, отличающаяся тем, что вирусный капсид имеет по меньшей мере 95% идентичности с аминокислотной последовательностью серотипа 1 (AAV1), серотипа 2 (AAV2), серотипа AAV2.7m8 (AAV2.7m8), серотипа 3 (AAV3), серотипа 3B (AAV3B), серотипа 4 (AAV4), серотипа 5 (AAV5), серотипа 6 (AAV6), серотипа 7 (AAV7), серотипа 8 (AAV8), серотипа rh8 (AAVrh8), серотипа 9 (AAV9), серотипа 9e (AAV9e), серотипа rh10 (AAVrh10), серотипа rh20 (AAVrh20), серотипа rh39 (AAVrh39), серотипа hu.37 (AAVhu.37), серотипа rh73 (AAVrh73), серотипа rh74 (AAVrh74), серотипа hu51 (AAV.hu51), серотипа hu21 (AAV.hu21), серотипа hu12 (AAV.hu12), или серотипа hu26 (AAV.hu26) AAV.
4. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1–3, отличающаяся тем, что капсид AAV представляет собой AAV8, AAV3B, AAV2.7m8 или AAVrh73.
5. Фармацевтическая композиция по пп. 1–4, отличающаяся тем, что клетка ткани глаза представляет собой клетку роговицы, клетку радужной оболочки, клетку цилиарного тела, клетку шлеммова канала, клетку трабекулярной сети, клетку сетчатки, клетку ткани ПЭС-хориоидеи или клетку зрительного нерва.

6. Фармацевтическая композиция по пп. 1–5, отличающаяся тем, что регуляторная последовательность включает регуляторную последовательность из таблицы 1 или 1а.
7. Фармацевтическая композиция по п. 5, отличающаяся тем, что регуляторная последовательность представляет собой промотор родопсинкиназы человека (GRK1) (SEQ ID NO:54 или 117), промотор аррестина колбочек мыши (CAR) (SEQ ID NO:114–116), промотор красного опсина человека (RedO) (SEQ ID NO:112), промотор CB (SEQ ID NO: 159), промотор CBLong (SEQ ID NO: 160) или промотор Best1/GRK (SEQ ID NO: 161).
8. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1–7, отличающаяся тем, что трансген кодирует сигнальную последовательность на N-конце Fc-слитого белка к TNF α , которая направляет секрецию и посттрансляционную модификацию в указанных клетках глаза человека.
9. Фармацевтическая композиция по п. 8, отличающаяся тем, что указанная сигнальная последовательность представляет собой MYRMQLLLLIASLALVTNS (SEQ ID NO: 62) или сигнальную последовательность из таблицы 2.
10. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1–8, отличающаяся тем, что трансген имеет структуру от N-конца к C-концу: сигнальная последовательность – растворимый внеклеточный домен TNFR – шарнирная область – домен Fc – поли(A).
11. Композиция по п. 10, отличающаяся тем, что трансген дополнительно содержит сайт расщепления тромбином SEQ ID NO:8 на C-конце растворимого внеклеточного домена TNFR.
12. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1–11, отличающаяся тем, что Fc-слитый белок к TNF α экспрессируется в виде димерного слитого белка.
13. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1–12, отличающаяся тем, что Fc-слитый белок к TNF α представляет собой этанерцепт или EYS606.
14. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1–13, отличающаяся тем, что указанный трансген содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 13–18.
15. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1–14, отличающаяся тем, что Fc-слитый белок к TNF α имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, 11 или 12.
16. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1–15, отличающаяся тем, что Fc-слитый белок к TNF α представляет собой гипергликозилированный мутант или при этом полипептид Fc Fc-слитого белка к TNF α является гликозилированным или агликозилированным.

17. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1–16, отличающаяся тем, что домен Fc представляет собой домен IgG1-Fc.
18. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1–17, отличающаяся тем, что искусственный геном является самокомплементарным.
19. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1–18, отличающаяся тем, что искусственный геном представляет собой конструкцию CAG.etanercept (SEQ ID NO: 15) или mU1a.Vh4i.etanercept.scAAV (SEQ ID NO: 17).
20. Композиция, содержащая вектор аденоассоциированного вируса (AAV), имеющий:
 - a. вирусный капсид AAV, который необязательно имеет по меньшей мере 95% идентичности с аминокислотной последовательностью серотипа 1 (AAV1), серотипа 2 (AAV2), серотипа AAV2.7m8 (AAV2.7m8), серотипа 3 (AAV3), серотипа 3B (AAV3B), серотипа 4 (AAV4), серотипа 5 (AAV5), серотипа 6 (AAV6), серотипа 7 (AAV7), серотипа 8 (AAV8), серотипа rh8 (AAVrh8), серотипа 9 (AAV9), серотипа 9e (AAV9e), серотипа rh10 (AAVrh10), серотипа rh20 (AAVrh20), серотипа rh39 (AAVrh39), серотипа hu.37 (AAVhu.37), серотипа rh73 (AAVrh73), серотипа rh74 (AAVrh74), серотипа hu51 (AAV.hu51), серотипа hu21 (AAV.hu21), серотипа hu12 (AAV.hu12), или серотипа hu26 (AAV.hu26) AAV.
 - b. искусственный геном, содержащий каскету экспрессии, фланкированную инвертированными концевыми повторами (ITR) AAV, где каскета экспрессии содержит трансген, кодирующий Fc-слитый белок к TNF- α , содержащий растворимый человеческий внеклеточный домен рецептора TNF α типа I (TNFR1) или типа II (TNFR2), ковалентно связанный пептидной связью с полипептидом, содержащим домен Fc тяжелой цепи иммуноглобулина, функционально связанный с одной или более регуляторными последовательностями, которые способствуют экспрессии трансгена в клетках ткани глаза человека;
при этом трансген кодирует сигнальную последовательность на N-конце указанного Fc-слитого белка к TNF α , которая направляет секрецию и посттрансляционную модификацию указанного Fc-слитого белка к TNF α в клетках ткани глаза.
21. Композиция по п. 20, отличающаяся тем, что трансген дополнительно содержит сайт расщепления тромбином SEQ ID NO:8 на C-конце растворимого человеческого внеклеточного домена TNFR.
22. Композиция по любому из п. 20 или п. 21, отличающаяся тем, что Fc-слитый белок к TNF α имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, 11, или 12.
23. Композиция по пп. 20–22, отличающаяся тем, что Fc-слитый белок к TNF α представляет собой этанерцепт или EYS606.

24. Композиция по пп. 20–23, отличающаяся тем, что клетка ткани глаза представляет собой клетку роговицы, клетку радужной оболочки, клетку цилиарного тела, клетку шлеммова канала, клетку трабекулярной сети, клетку сетчатки, клетку ткани ПЭС-хориоидеи или клетку зрительного нерва.
25. Композиция по пп. 20–24, отличающаяся тем, что указанный трансген содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 13 или 14.
26. Композиция по пп. 20–25, отличающаяся тем, что указанная сигнальная последовательность представляет собой MYRMQLLLLIASLALVTNS (SEQ ID NO: 62) или сигнальную последовательность из таблиц 2 или 3.
27. Композиция по любому из пп. 20–26, отличающаяся тем, что искусственный геном является самокомплементарным.
28. Композиция по любому из пп. 20–27, отличающаяся тем, что искусственный геном представляет собой конструкцию CAG.etanercept (SEQ ID NO: 15 или 16) или mU1a.Vh4i.etanercept.scAAV (SEQ ID NO: 17 или 18).
29. Способ лечения неинфекционного увеита у субъекта-человека, нуждающегося в этом, включающий субретинальное, интравитреальное, интраназальное, интракамеральное, супрахориоидальное или системное введение субъекту терапевтически эффективного количества композиции, содержащей рекомбинантный AAV, содержащий трансген, кодирующий Fc-слитый белок к TNF α , функционально связанный с одной или более регуляторными последовательностями, которые контролируют экспрессию трансгена в клетках ткани глаза.
30. Способ лечения неинфекционного увеита у субъекта-человека, нуждающегося в этом, включающий: субретинальное, интравитреальное, интраназальное, интракамеральное, супрахориоидальное или системное введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества рекомбинантного нуклеотидного вектора экспрессии, содержащего трансген, кодирующий Fc-слитый белок к TNF α , функционально связанный с одной или более регуляторными последовательностями, которые регулируют экспрессию трансгена в клетках ткани глаза человека, так что образуется депо, которое высвобождает человеческую посттрансляционно модифицированную (чПМ) форму Fc-слитого белка к TNF α .
31. Способ по п. 29 и п. 30, отличающийся тем, что клетка ткани глаза представляет собой клетку роговицы, клетку радужной оболочки, клетку цилиарного тела, клетку шлеммова канала, клетку трабекулярной сети, клетку сетчатки, клетку ткани ПЭС-хориоидеи или клетку зрительного нерва.

32. Способ по пп. 29–31, отличающийся тем, что указанный Fc-слитый белок к TNF- α содержит растворимый внеклеточный домен рецептора TNF α типа I (TNFR1) или типа II (TNFR2), ковалентно связанный с доменом Fc IgG.
33. Способ по пп. 29–32, отличающийся тем, что указанный трансген представляет собой этанерцепт или EYS606.
34. Способ по пп. 29–33, отличающийся тем, что указанный трансген имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 13–18.
35. Способ по пп. 29–34, отличающийся тем, что вирусный капсид имеет по меньшей мере 95% идентичности с аминокислотной последовательностью серотипа 1 (AAV1), серотипа 2 (AAV2), серотипа AAV2.7m8, серотипа 3 (AAV3), серотипа 3B (AAV3B), серотипа 4 (AAV4), серотипа 5 (AAV5), серотипа 6 (AAV6), серотипа 7 (AAV7), серотипа 8 (AAV8), серотипа rh8 (AAVrh8), серотипа 9 (AAV9), серотипа 9e (AAV9e), серотипа rh10 (AAVrh10), серотипа rh20 (AAVrh20), серотипа rh39 (AAVrh39), серотипа hu.37 (AAVhu.37), серотипа rh73 (AAVrh73), серотипа rh74 (AAVrh74), серотипа hu51 (AAV.hu51), серотипа hu21 (AAV.hu21), серотипа hu12 (AAV.hu12) или серотипа hu26 (AAV.hu26) AAV.
36. Способ по любому из пп. 29–35, отличающийся тем, что капсид AAV представляет собой AAV8, AAV2.7m8, AAV3B или AAVrh73.
37. Способ по любому из пп. 29–36, отличающийся тем, что регуляторная последовательность включает регуляторную последовательность из таблицы 1 или 1a.
38. Способ по п. 37, отличающийся тем, что регуляторная последовательность представляет собой промотор родопсинкиназы человека (GRK1) (SEQ ID NO:54 или 117), промотор аррестина колбочек мыши (CAR) (SEQ ID NO:114–116) или промотор красного опсина человека (RedO) (SEQ ID NO:112).
39. Способ по любому из пп. 29–38, отличающийся тем, что трансген кодирует сигнальную последовательность на N-конце Fc-слитого белка к TNF α , которая направляет секрецию и посттрансляционную модификацию в указанных клетках ткани глаза человека.
40. Композиция по п. 39, отличающаяся тем, что указанная сигнальная последовательность представляет собой MYRMQLLLLIASLALVTNS (SEQ ID NO: 62) или сигнальную последовательность из таблиц 2 или 3.
41. Способ по любому из пп. 25–40, отличающийся тем, что трансген имеет структуру: сигнальная последовательность – человеческий растворимый внеклеточный домен TNFR (тип 1 или тип 2) – шарнирная область – домен Fc – поли(A).

42. Способ по п. 41, отличающийся тем, что трансген дополнительно содержит сайт расщепления тромбином, имеющий SEQ ID NO:8 на С-конце растворимого внеклеточного домена TNFR человека.
43. Способ по любому из пп. 29–42, отличающийся тем, что Fc-слитый белок к TNF α представляет собой гипергликозилированный мутант или при этом домен Fc из Fc-слитого белка к TNF α является гликозилированным или агликозилированным.
44. Способ по любому из пп. 29–43, отличающийся тем, что Fc-слитый белок к TNF α содержит альфа-2,6-сиалилированный гликан.
45. Способ по любому из пп. 29–44, отличающийся тем, что Fc-слитый белок к TNF α является гликозилированным, но не содержит обнаруживаемый NeuGc и/или α -Gal.
46. Способ по любому из пп. 29–45, отличающийся тем, что Fc-слитый белок к TNF α имеет сульфатирование тирозина.
47. Способ по любому из пп. 29–46, отличающийся тем, что продуцирование указанной чПМ формы Fc-слитого белка к TNF α подтверждается путем трансдукции клеток глаза человека в культуре указанным рекомбинантным нуклеотидным вектором экспрессии и экспрессии указанного Fc-слитого белка к TNF α .
48. Способ по п. 29 или п. 47, отличающийся тем, что терапевтически эффективное количество определяется как достаточное для улучшения остроты зрения с максимальной коррекцией (BCVA) на ≥ 2 строки ETDRS или увеличения logMAR, снижения воспалительной активности передней и задней камеры в соответствии с классификацией SUN и/или снижения степени помутнения стекловидного тела.
49. Способ по любому из пп. 29–48, отличающийся тем, что gAAV является самокомплементарным.
50. Способ по любому из пп. 29–49, отличающийся тем, что трансген в составе конструкции CAG.etanercept или mU1a.Vh4i.etanercept.scAAV.
51. Способ получения рекомбинантных AAV, включающий:
 - (с) культивирование клетки-хозяина, содержащей:
 - (i) искусственный геном, содержащий *цис*-кассету экспрессии, фланкированную ITR AAV, при этом *цис*-кассета экспрессии содержит трансген, кодирующий Fc-слитый белок к TNF α , причем Fc-слитый белок к TNF α содержит растворимую внеклеточную часть рецептора TNF α человека типа I (TNFR1) или типа II (TNFR2), ковалентно связанную пептидной связью с полипептидом, содержащим домен Fc тяжелой цепи иммуноглобулина, функционально связанный с одной или более

регуляторными последовательностями, которые способствуют экспрессии трансгена в клетках ткани глаза человека;

(ii) *транс*-кассету экспрессии, лишенную ITR AAV, где транс-кассета экспрессии кодирует ген AAV и капсидный белок AAV, функционально связанную с элементами контроля экспрессии, которые управляют экспрессией ген AAV и капсидного белка AAV в клетке-хозяине в культуре и обеспечивает ген AAV и капсидный белок AAV в *транс*-расположении; при этом капсид имеет тропизм к тканям глаза;

(iii) достаточное функционирование хелпера аденовируса для обеспечения репликации и упаковки искусственного генома капсидным белком AAV;

и

(d) выделение рекомбинантного AAV, инкапсулирующего искусственный геном, из культуры клеток.

52. Способ по п. 51, отличающийся тем, что клетка ткани глаза представляет собой клетку роговицы, клетку радужной оболочки, клетку цилиарного тела, клетку шлеммова канала, клетку трабекулярной сети, клетку сетчатки, клетку ткани ПЭС-хориоидеи или клетку зрительного нерва.

53. Способ по пунктам 51 или 52, отличающийся тем, что трансген кодирует этанерцепт или EYS606, при этом капсидный белок AAV представляет собой капсидный белок гAAV согласно варианту осуществления 1, при этом указанный капсидный белок происходит по меньшей мере из одного серотипа AAV из серотипа 1 (AAV1), серотипа 2 (AAV2), серотипа 2.7m8, серотипа 3 (AAV3), серотипа 3B (AAV3B), серотипа 4 (AAV4), серотипа 5 (AAV5), серотипа 6 (AAV6), серотипа 7 (AAV7), серотипа 8 (AAV8), серотипа rh8 (AAVrh8), серотипа 9 (AAV9), серотипа 9e (AAV9e), серотипа rh10 (AAVrh10), серотипа rh20 (AAVrh20), серотипа rh39 (AAVrh39), серотипа hu.37 (AAVhu.37), серотипа rh73 (AAVrh73), серотипа rh74 (AAVrh74), серотипа hu51 (AAV.hu51), серотипа hu21 (AAV.hu21), серотипа hu12 (AAV.hu12) или серотипа hu26 (AAV.hu26) AAV.

54. Клетка-хозяин, содержащая:

d. искусственный геном, содержащий *цис*-кассету экспрессии, фланкированную ITR AAV, при этом *цис*-кассета экспрессии содержит трансген, кодирующий Fc-слитый белок к TNF α , причем Fc-слитый белок к TNF α содержит растворимую внеклеточную часть рецептора TNF α человека типа I (TNFR1) или типа II (TNFR2), ковалентно связанную пептидной связью с полипептидом, содержащим домен Fc тяжелой цепи иммуноглобулина,

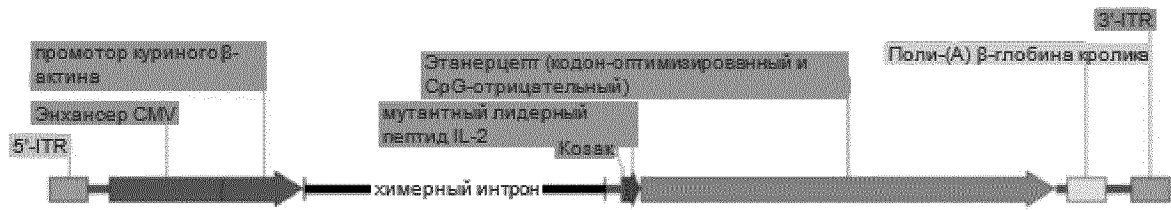
функционально связанный с одной или более регуляторными последовательностями, которые способствуют экспрессии трансгена в клетках ткани глаза человека;

- e. *транс*-кассету экспрессии, лишенную ITR AAV, где транс-кассета экспрессии кодирует гер AAV и капсидный белок AAV, функционально связанную с элементами контроля экспрессии, которые управляют экспрессией гер AAV и капсидного белка AAV в клетке-хозяине в культуре и обеспечивает гер AAV и капсидный белок AAV в *транс*-расположении; при этом капсид имеет тропизм к тканям глаза;
- f. обеспечение хелперных функций аденовируса для обеспечения репликации и упаковки искусственного генома капсидным белком AAV.

55. Клетка-хозяин по п. 54, отличающаяся тем, что трансген кодирует этанерцепт или EYS606.

56. Клетка-хозяин по п. 53 или п. 54, отличающаяся тем, что капсидный белок AAV имеет серотип 1 (AAV1), серотип 2 (AAV2), серотип 2.7m8 (AAV2.7m8), серотип 3 (AAV3), серотип 3B (AAV3B), серотип 4 (AAV4), серотип 5 (AAV5), серотип 6 (AAV6), серотип 7 (AAV7), серотип 8 (AAV8), серотип rh8 (AAVrh8), серотип 9 (AAV9), серотип 9e (AAV9e), серотип rh10 (AAVrh10), серотип rh20 (AAVrh20), серотип rh39 (AAVrh39), серотип hu.37 (AAVhu.37), серотип rh73 (AAVrh73), серотип rh74 (AAVrh74), серотип hu51 (AAV.hu51), серотип hu21 (AAV.hu21), серотип hu12 (AAV.hu12), или серотип hu26 (AAV.hu26) AAV.

Фиг. 1



Фиг. 2А СЛИТАЯ КОНСТРУКЦИЯ TNFR2:Fc ЭТАНЕРЦЕПТ:

Лидер:

MYRMQLLLLIALLSLALVTNS (SEQ ID NO:62)

Слитый белок TNFR2:Fc Этанерцепт (SEQ ID NO:10):

LPAQVAFTPY APEPGSTCRL REYYDQTAQM CCSKCSPGQH AKVFCTKTS TVCDSCEDST YTQLWNWVPE
 CLSCGSRCS DQVETQACTR EQNRICTCRP GWYCALSKQE GCRLCAPLRK CRPGFGVARP GTETSDVVCK
 PCAPGTFSNT TSSTDICRPH QICNVVAIPG NASMDAVCTS TSPTRSMAPG AVHLPQPVST RSQHTQPTPE
 PSTAPSTSFL LPMGPSPPAE GSTGDEPKSC DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPKPKDT LMISRTPEVT
 CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQVNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
 PIEKTISKAK GQPREPQVYV LPPSREEMTK NOVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTFPVLDS
 DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSPGK

Условные обозначения:

Внеклеточный домен TNFR p75 не выделен

Домен Fc IgG1 выделен серым цветом

Сайт O-гликозилирования подчеркнут и выделен

(S/T)XN или NX(S/T) = Неконсенсусный сайт гликозилирования по аспарагину

(N) EPKSCDKTHTCPPEPELLGG = шарнирная область (SEQ ID NO:145)

Фиг. 2В СЛИТАЯ КОНСТРУКЦИЯ EYS606 TNFR1:Fc:

Лидер (SEQ ID NO: 62):

MYRMQLLLLLIALSLALVTNS

Слитый белок EYS606 TNFR1:Fc (SEQ ID NO:12):

MGLSTVPDLLLPIVLELLVGIYPSGVI GLVPHLGDREKRDSVCPQGKYIHPQ**NNS**ICCTKCHKGTLYNDPCPGPQ
 DTDCRECESGSFTA**SEN**HLRHCLSCSKCRKEMGQVEISSCTVDRDRTVCGCRKNQYRHYW**SEN**LFQCF**NCS**LCL**NGTV**
 HLSCQEKQNTVCTCHAGFFLRENECVSCSNCKKSL**ECT**KLCLPQIENVKGTEDSGT**TLVPRGS****DKTHTCPPCPAPEL**
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST**YRVVSVLTVLHQ**
 DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKAKAGQPREPQVYTLPPSREEM**TKN**QVSLTCLLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
 NNYKTTTPVLDSDGS

Условные обозначения:

Внеклеточный домен TNFR p55 выделен жирным шрифтом

Домен Fc IgG1 выделен серым цветом

Сайт O-гликозилирования выделен и подчеркнут

(S/T)XN или **NX(S/T)** = Консенсусный/неконсенсусный сайт гликозилирования по аспарагину (N) **LVPRGS**: Сайт расщепления тромбином (SEQ ID NO:8)

DKTHTCPPCPAPELGG = Шарнирная область (SEQ ID NO:21)

Фиг. 3

AAV1	MAADGYLPDWLEDNLSEGI	REWWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLP	PGYKYL	GPFNGLD	60	
AAV2	MAADGYLPDWLEDTLSEGI	RQWWKPKPGPPP	PKPAERHKDDSRGLVLP	PGYKYL	GPFNGLD	60
AAV3	MAADGYLPDWLEDNLSEGI	REWWALKPGVPPKANQQHQDNRRGLVLP	PGYKYL	GPFNGLD	60	
AAV3-3	MAADGYLPDWLEDNLSEGI	REWWALKPGVPPKANQQHQDNRRGLVLP	PGYKYL	GPFNGLD	60	
AAV3B	MAADGYLPDWLEDNLSEGI	REWWALKPGVPPKANQQHQDNRRGLVLP	PGYKYL	GPFNGLD	60	
AAV4	-MTDGYLPDWLEDNLSEGV	REWWALQPGAPKPKANQQHQDNARGLVLP	PGYKYL	GPFNGLD	59	
AAV4-4	-MTDGYLPDWLEDNLSEGV	REWWALQPGAPKPKANQQHQDNARGLVLP	PGYKYL	GPFNGLD	59	
AAV5	MSFVDHPPDWLEE-V	EGLEFLGLEAGPPKPKPNQQHQDQARGLVLP	PGYNYL	GPFNGLD	59	
AAV6	MAADGYLPDWLEDNLSEGI	REWWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLP	PGYKYL	GPFNGLD	60	
AAV7	MAADGYLPDWLEDNLSEGI	REWWDLKPGAPKPKANQQKQDNARGLVLP	PGYKYL	GPFNGLD	60	
AAV8	MAADGYLPDWLEDNLSEGI	REWWALKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLP	PGYKYL	GPFNGLD	60	
AAV9	MAADGYLPDWLEDNLSEGI	REWWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLP	PGYKYL	GPFNGLD	60	
AAV9e	MAADGYLPDWLEDNLSEGI	REWWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLP	PGYKYL	GPFNGLD	60	
rh. 10	MAADGYLPDWLEDNLSEGI	REWWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLP	PGYKYL	GPFNGLD	60	
rh. 20	MAADGYLPDWLEDNLSEGI	REWWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLP	PGYKYL	GPFNGLD	60	
rh. 39	MAADGYLPDWLEDNLSEGI	REWWALKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLP	PGYKYL	GPFNGLD	60	
rh. 73	MAADGYLPDWLEDNLSEGI	REWWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLP	PGYKYL	GPFNGLD	60	
rh. 74v1	MAADGYLPDWLEDNLSEGI	REWWDLKPGAPKPKANQQKQDNARGLVLP	PGYKYL	GPFNGLD	60	
rh. 74v2	MAADGYLPDWLEDNLSEGI	REWWDLKPGAPKPKANQQKQDNARGLVLP	PGYKYL	GPFNGLD	60	
hu. 12	MAADGYLPDWLEDTLSEGI	RQWWKPKPGPPP	PKPAERHQDDSRGLVLP	PGYKYL	GPFNGLD	60
hu. 21	MAADGYLPDWLEDTLSEGI	RQWWKPKPGPPP	PKPAERHKDDSRGLVLP	PGYKYL	GPFNGLD	60
hu. 26	MAADGYLPDWLEDTLSEGI	RQWWKPKPGPPP	PKPAERHKDDSRGLVLP	PGYKYL	GPFNGLD	60
hu. 37	MAADGYLPDWLEDNLSEGI	REWWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLP	PGYKYL	GPFNGLD	60	
hu. 51	MAADGYLPDWLEDTLSEGI	RQWWKPKPGPPP	PKPAERHKDDSRGLVLP	PGYKYL	GPFNGLD	60
hu. 53	MAADGYLPDWLEDTLSEGI	RQWWKPKPGPPP	PKPAERHKDDSRGLVLP	PGYKYL	GPFNGLD	60
	.. *****:	:.****:	*: * * **	::::*:	*****:****	****

Фиг. 3 (продолжение)

AAV1	KGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADAEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQ	120
AAV2	KGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADAEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQ	120
AAV3	KGEPVNEADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQ	120
AAV3-3	KGEPVNEADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQ	120
AAV3B	KGEPVNEADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQ	120
AAV4	KGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQ	119
AAV4-4	KGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQ	119
AAV5	RGEPVNRADAVAREHDI SYNEQLEAGDNPYLKYNHADAEFQERLADDTSGGNLGRAVFQ	119
AAV6	KGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADAEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQ	120
AAV7	KGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADAEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQ	120
AAV8	KGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLQAGDNPYLRYNHADAEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQ	120
AAV9	KGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQ	120
AAV9e	KGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQ	120
rh.10	KGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADAEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQ	120
rh.20	KGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADAEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQ	120
rh.39	KGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADAEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQ	120
rh.73	KGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADAEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQ	120
rh.74v1	KGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLQAGDNPYLRYNHADAEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQ	120
rh.74v2	KGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLQAGDNPYLRYNHADAEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQ	120
hu.12	KGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADAEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQ	120
hu.21	KGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADAEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQ	120
hu.26	KGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADAEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQ	120
hu.37	KGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADAEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQ	120
hu.51	KGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADAEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQ	120
hu.53	KGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADAEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQ	120
AAV1	AKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEQSPQ-EPDSSSGIGKTGQQPAKKRLNFGQTGDS	179
AAV2	AKKRVLEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPV-EPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDA	179
AAV3	AKKRILEPLGLVEEAAKTAPGKKGAVDQSPQ-EPDSSSGVGKSGKQPARKRLNFGQTGDS	179
AAV3-3	AKKRILEPLGLVEEAAKTAPGKKGAVDQSPQ-EPDSSSGVGKSGKQPARKRLNFGQTGDS	179
AAV3B	AKKRILEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVDQSPQ-EPDSSSGVGKSGKQPARKRLNFGQTGDS	179
AAV4	AKKRVLEPLGLVEQAGETAPGKKRPLIESPQ-QPDSSTGIGKKGQPAAKKLVEFEDTGA	178
AAV4-4	AKKRVLEPLGLVEQAGETAPGKKRPLIESPQ-QPDSSTGIGKKGQPAAKKLVEFEDTGA	178
AAV5	AKKRVLEPFLGLVEEGAKTAPTGRIDDHFPKRKKARTEEDSKP-----STSSDA	168
AAV6	AKKRVLEPFLGLVEEGAKTAPGKKRPVEQSPQ-EPDSSSGIGKTGQQPAKKRLNFGQTGDS	179
AAV7	AKKRVLEPLGLVEEGAKTAPAKKRPVEPSPQRS PDSSTGIGKKGQPARKRLNFGQTGDS	180
AAV8	AKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEPSPQRS PDSSTGIGKKGQPARKRLNFGQTGDS	180
AAV9	AKKRILLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEQSPQ-EPDSSAGIGKSGAQPAKKRLNFGQTGDT	179
AAV9e	AKKRILLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEQSPQ-EPDSSAGIGKSGAQPAKKRLNFGQTGDT	179
rh.10	AKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEPSPQRS PDSSTGIGKKGQPARKRLNFGQTGDS	180
rh.20	AKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEPSPQRS PDSSTGIGKTGQQPAKKRLNFGQTGDS	180
rh.39	AKKRVLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEPSPQRS PDSSTGIGKKGQPARKRLNFGQTGDS	180
rh.73	AKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEPSPQRS PDSSTGIGKKGQPARKRLNFGQTGDS	180
rh.74v1	AKKRVLEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEPSPQRS PDSSTGIGKKGQPARKRLNFGQTGDS	180
rh.74v2	AKKRVLEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEPSPQRS PDSSTGIGKKGQPARKRLNFGQTGDS	180
hu.12	AKKRVLEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPV-EPDSSSGTGKAGHPARKRLNFGQTGDA	179
hu.21	AKKRILEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPA-EPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDA	179
hu.26	AKKRILEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPA-EPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDA	179
hu.37	AKKRVLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEPSPQRS PDSSTGIGKKGQPARKRLNFGQTGDS	180
hu.51	AKKRVLEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPV-EPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDA	179
hu.53	AKKRVLEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPA-EPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDA	179

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

Фиг. 3 (продолжение)

AAV1	ESVP-DPQPLGEPATPAAVGPTTMSAGGGAPMADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDR	238
AAV2	DSVP-DPQPLGQPPAAPSGLGTNTMATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWVGDR	238
AAV3	ESVP-DPQPLGEPAAAPTSLGSNTMASGGGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSQWLGD	238
AAV3-3	ESVP-DPQPLGEPAAAPTSLGSNTMASGGGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSQWLGD	238
AAV3B	ESVP-DPQPLGEPAAAPTSLGSNTMASGGGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSQWLGD	238
AAV4	GDGP----PEGSTSGAMS--DDEEMRAAAGGAAVEGGQGADGVGNASGDWHCDSTWSEGH	232
AAV4-4	GDGP----PEGSTSGAMS--DDEEMRAAAGGAAVEGGQGADGVGNASGDWHCDSTWSEGH	232
AAV5	EAGPSGSQQLQIPAQPASSLGADTMSAGGGGPLGDNNQADGVGNASGDWHCDSTWVGDR	228
AAV6	ESVP-DPQPLGEPATPAAVGPTTMSAGGGAPMADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDR	238
AAV7	ESVP-DPQPLGEPAAAPS SVGSGTVAAGGGAPMADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDR	239
AAV8	ESVP-DPQPLGEPAAAPSGVGPNTMAAGGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGDR	239
AAV9	ESVP-DPQPIGEPAAAPSGVGS LTMASGGGAPVADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGDR	238
AAV9e	ESVP-DPQPIGEPAAAPSGVGS LTMASGGGAPVADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGDR	238
rh.10	ESVP-DPQPIGEPAPGSGLGS GTMAAGGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGDR	239
rh.20	ESVP-DPQPIGEPAPGSGLGS GTMAAGGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGDR	239
rh.39	ESVP-DPQPIGEPAPGSGLGS GTMAAGGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGDR	239
rh.73	ESVP-DPQPLGEPAAAPSSVSGSGTMAAGGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGDR	239
rh.74v1	ESVP-DPQPIGEPAPGSGLGS GTMAAGGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGDR	239
rh.74v2	ESVP-DPQPIGEPAPGSGLGS GTMAAGGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGDR	239
hu.12	DSVP-DPQPLGQPPAAPSTSLGSTTMTATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSQWLGD	238
hu.21	DSVP-DPRPLGQPPAAPSGLGTNTMATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWVGDR	238
hu.26	DSVP-DPQPLGQPPAAPSGLGTNTMATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWVGDR	238
hu.37	ESVP-DPQPIGEPAPGSGLGS GTMAAGGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGDR	239
hu.51	DSVP-DPQPLGQPPAAPSGLGTNTMATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWVGDR	238
hu.53	DSVP-DPQPLRQPPAAPSTSLGSTTMTATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSQWLGD	238
	* : : : : : * : : : : * : : : : * : : : : *	
AAV1	VITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSAST-GASNDNHYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSRWD	297
AAV2	VITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQ-S-GASNDNHYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSRWD	296
AAV3	VITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQ-S-GASNDNHYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSRWD	296
AAV3-3	VITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQ-S-GASNDNHYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSRWD	296
AAV3B	VITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQ-S-GASNDNHYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSRWD	296
AAV4	VTTTSTRTWLPTYNNHLYKRLGE----SLQSNYNGFSTPWGYFDNRFHCHFSRWD	287
AAV4-4	VTTTSTRTWLPTYNNHLYKRLGE----SLQSNYNGFSTPWGYFDNRFHCHFSRWD	287
AAV5	VTKSTRTWLPSYNNHLYREIKSGSVD-GSNANAYFGYSTPWGYFDNRFHSHWSRWD	287
AAV6	VITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSAST-GASNDNHYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSRWD	297
AAV7	VITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSETA-GSTNDNTYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSRWD	298
AAV8	VITTSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGATNDNTYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSRWD	299
AAV9	VITTSTRTWALPTYNNHLYKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSRWD	298
AAV9e	VITTSTRTWALPTYNNHLYKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSRWD	298
rh.10	VITTSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGSTNDNTYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSRWD	299
rh.20	VITTSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGSTNDNTYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSRWD	299
rh.39	VITTSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGSTNDNTYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSRWD	299
rh.73	VITTSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGSTNDNTYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSRWD	299
rh.74v1	VITTSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGSTNDNTYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSRWD	299
rh.74v2	VITTSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGSTNDNTYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSRWD	299
hu.12	VITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQS--GASNDNHYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSRWD	296
hu.21	VITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQS--GASNDNHYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSRWD	296
hu.26	VITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQS--GASNDNHYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSRWD	296
hu.37	VITTSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGSTNDNTYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSRWD	299
hu.51	VITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQS--GASNDNHYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSRWD	296
hu.53	VITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQS--GASNDNHYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSRWD	296
	* * : : : * * : : : * * : : : * * : : : *	

Фиг. 3 (продолжение)

AAV1	QRLINNNWGF	RPKRLNFKLFNIQVKEVT	TNDGVTTIANNLT	STVQVFTSDSEYQLP	PYVLGS	357
AAV2	QRLINNNWGF	RPKRLNFKLFNIQVKEVT	QNDGTTTIANNLT	STVQVFTDSEYQLP	PYVLGS	356
AAV3	QRLINNNWGF	RPKRLNFKLFNIQVKEVT	QNDGTTTIANNLT	STVQVFTDSEYQLP	PYVLGS	356
AAV3-3	QRLINNNWGF	RPKRLNFKLFNIQVKEVT	QNDGTTTIANNLT	STVQVFTDSEYQLP	PYVLGS	356
AAV3B	QRLINNNWGF	RPKRLNFKLFNIQVKEVT	QNDGTTTIANNLT	STVQVFTDSEYQLP	PYVLGS	356
AAV4	QRLINNNWGM	RPKAMRVKIFNIQVKEVT	TSGETTIVANNLT	STVQIFADSSYELP	YVMDA	347
AAV4-4	QRLINNNWGM	RPKAMRVKIFNIQVKEVT	TSGETTIVANNLT	STVQIFADSSYELP	YVMDA	347
AAV5	QRLINNYWGF	RPKRLNFKLFNIQVKEVT	QNDGTTTIANNLT	STVQVFTDDDYQLP	PYVGN	347
AAV6	QRLINNNWGF	RPKRLNFKLFNIQVKEVT	TNDGVTTIANNLT	STVQVFTSDSEYQLP	PYVLGS	357
AAV7	QRLINNNWGF	RPKRLNFKLFNIQVKEVT	TNDGVTTIANNLT	STIQVFTSDSEYQLP	PYVLGS	358
AAV8	QRLINNNWGF	RPKRLNFKLFNIQVKEVT	QNEGTKTIAN	NLTSTIQVFTDSEYQLP	PYVLGS	359
AAV9	QRLINNNWGF	RPKRLNFKLFNIQVKEVT	DNNGVKTIANN	NLTSTVQVFTSDSYQLP	PYVLGS	358
AAV9e	QRLINNNWGF	RPKRLNFKLFNIQVKEVT	DNNGVKTIANN	NLTSTVQVFTSDSYQLP	PYVLGS	358
rh. 10	QRLINNNWGF	RPKRLNFKLFNIQVKEVT	QNEGTKTIAN	NLTSTIQVFTDSEYQLP	PYVLGS	359
rh. 20	QRLINNNWGF	RPKRLNFKLFNIQVKEVT	QNEGTKTIAN	NLTSTIQVFTDSEYQLP	PYVLGS	359
rh. 39	QRLINNNWGF	RPKRLNFKLFNIQVKEVT	QNEGTKTIAN	NLTSTIQVFTDSEYQLP	PYVLGS	359
rh. 73	QRLINNNWGF	RPKRLNFKLFNIQVKEVT	QNEGTKTIAN	NLTSTIQVFTDSEYQLP	PYVLGS	359
rh. 74v1	QRLINNNWGF	RPKRLNFKLFNIQVKEVT	QNEGTKTIAN	NLTSTIQVFTDSEYQLP	PYVLGS	359
rh. 74v2	QRLINNNWGF	RPKRLNFKLFNIQVKEVT	QNEGTKTIAN	NLTSTIQVFTDSEYQLP	PYVLGS	359
hu. 12	QRLINNNWGF	RPKRLNFKLFNIQVKEVT	QNDGTTTIANN	NLTSTVQVFTDSEYQLP	PYVLGS	359
hu. 21	QRLINNNWGF	RPKRLNFKLFNIQVKEVT	QNDGTTTIANN	NLTSTVQVFTDSEYQLP	PYVLGS	356
hu. 26	QRLINNNWGF	RPKRLNFKLFNIQVKEVT	QNDGTTTIANN	NLTSTVQVFTDSEYQLP	PYVLGS	356
hu. 37	QRLINNNWGF	RPKRLNFKLFNIQVKEVT	QNEGTKTIAN	NLTSTIQVFTDSEYQLP	PYVLGS	359
hu. 51	QRLINNNWGF	RPKRLNFKLFNIQVKEVT	QNDGTTTIANN	NLTSTVQVFTDSEYQLP	PYVLGS	356
hu. 53	QRLINNNWGF	RPKRLNFKLFNIQVKEVT	QNDGTTTIANN	NLTSTVQVFTDSEYQLP	PYVLGS	356

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

AAV1	AHQGCLPP	FPADVFMI	PQYGYLTLNNG	---SQAVGRSSFYCLEYF	PSQMLRTGNNFTFSY	414
AAV2	AHQGCLPP	FPADVFMPQYGYLTLNNG	---SQAVGRSSFYCLEYF	PSQMLRTGNNFTFSY	413	
AAV3	AHQGCLPP	FPADVFMPQYGYLTLNNG	---SQAVGRSSFYCLEYF	PSQMLRTGNNFQFSY	413	
AAV3-3	AHQGCLPP	FPADVFMPQYGYLTLNNG	---SQAVGRSSFYCLEYF	PSQMLRTGNNFQFSY	413	
AAV3B	AHQGCLPP	FPADVFMPQYGYLTLNNG	---SQAVGRSSFYCLEYF	PSQMLRTGNNFQFSY	413	
AAV4	GQEGSLPP	FPNDVFMV	PQYGYCGLVTGNTS	QQQTDNRN	FYCLEYFPSQMLRTGNNFEITY	407
AAV4-4	GQEGSLPP	FPNDVFMV	PQYGYCGLVTGNTS	QQQTDNRN	FYCLEYFPSQMLRTGNNFEITY	407
AAV5	GTEGCLPA	FPQVFTL	PQYGYATLNRDNT	-ENPTERS	SFFCYCLEYFPSQMLRTGNNFEITY	406
AAV6	AHQGCLPP	FPADVFMI	PQYGYLTLNNG	---SQAVGRSSFYCLEYF	PSQMLRTGNNFTFSY	414
AAV7	AHQGCLPP	FPADVFMI	PQYGYLTLNNG	---SQAVGRSSFYCLEYF	PSQMLRTGNNFEFSY	415
AAV8	AHQGCLPP	FPADVFMI	PQYGYLTLNNG	---SQAVGRSSFYCLEYF	PSQMLRTGNNFQFTY	416
AAV9	AHEGCLPP	FPADVFMI	PQYGYLTLNDG	---SQAVGRSSFYCLEYF	PSQMLRTGNNFQFSY	415
AAV9e	AHEGCLPP	FPADVFMI	PQYGYLTLNDG	---SQAVGRSSFYCLEYF	PSQMLRTGNNFQFSY	415
rh. 10	AHQGCLPP	FPADVFMI	PQYGYLTLNNG	---SQAVGRSSFYCLEYF	PSQMLRTGNNFEFSY	416
rh. 20	AHQGCLPP	FPADVFMI	PQYGYLTLNNG	---SQAVGRSSFYCLEYF	PSQMLRTGNNFEFSY	416
rh. 39	AHQGCLPP	FPADVFMI	PQYGYLTLNNG	---SQAVGRSSFYCLEYF	PSQMLRTGNNFEFSY	416
rh. 73	AHQGCLPP	FPADVFMI	PQYGYLTLNNG	---SQAVGRSSFYCLEYF	PSQMLRTGNNFEFSY	416
rh. 74v1	AHQGCLPP	FPADVFMI	PQYGYLTLNNG	---SQAVGRSSFYCLEYF	PSQMLRTGNNFEFSY	416
rh. 74v2	AHQGCLPP	FPADVFMI	PQYGYLTLNNG	---SQAVGRSSFYCLEYF	PSQMLRTGNNFEFSY	416
hu. 12	AHQGCLPP	FPADVFMPQYGYLTLNNG	---SQAVGRSSFYCLEYF	PSQMLRTGNNFTFSY	413	
hu. 21	AHQGCLPP	FPADVFMPQYGYLTLNNG	---SQAVGRSSFYCLEYF	PSQMLRTGNNFTFSY	413	
hu. 26	AHQGCLPP	FPADVFMPQYGYLTLNNG	---SQAVGRSSFYCLEYF	PSQMLRTGNNFTFSY	413	
hu. 37	AHQGCLPP	FPADVFMI	PQYGYLTLNNG	---SQAVGRSSFYCLEYF	PSQMLRTGNNFEFSY	416
hu. 51	AHQGCLPP	FPADVFMPQYGYLTLNNG	---SQAVGRSSFYCLEYF	PSQMLRTGNNFTFSY	413	
hu. 53	AHQGCLPP	FPADVFMPQYGYLTLNNG	---SQAVGRSSFYCLEYF	PSQMLRTGNNFQFSY	413	

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

Фиг. 3 (продолжение)

AAV1	TFEEVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLNRTON-QSGSAQNKDLLFSRQAGPQMSV	473
AAV2	TFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTN-TPSGTTTQSRLLFSQAGASDIRD	472
AAV3	TFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLNRTOGTTSGTTNQSRLLFQAGPQMSV	473
AAV3-3	TFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLNRTOGTTSGTTNQSRLLFQAGPQMSV	473
AAV3B	TFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLNRTOGTTSGTTNQSRLLFQAGPQMSV	473
AAV4	SFEKVPFHSMYAHSQSLDRLMNPLIDQYLWGLQSTTTGTTLNAGTATTNFTKLRPTNFSN	467
AAV4-4	SFEKVPFHSMYAHSQSLDRLMNPLIDQYLWGLQSTTTGTTLNAGTATTNFTKLRPTNFSN	467
AAV5	NFEEVPFHSSFAFSQNLFKLANPLVDQYLYRFVSTNNTG-----GVQFNKLAGRYAN	459
AAV6	TFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLNRTON-QSGSAQNKDLLFSRQAGPQMSV	473
AAV7	SFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLARTQSNPGGTAGNRELQFYQGGPSTMAE	475
AAV8	TFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTQT-TGGTANTQTLGFSQGGPNTMAN	475
AAV9	EFENVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSKTINGS--CQNQOTLKFSVAGPSNMAV	473
AAV9e	EFENVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSKTINGS--CQNQOTLKFSVAGPSNMAV	473
rh.10	QFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTQS-TGGTAGTQQLLFSQAGPNNMSA	475
rh.20	QFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTQS-TGGTAGTQQLLFSQAGPNNMSA	475
rh.39	TFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTQS-TGGTQGTQQLLFSQAGPANMSA	475
rh73	TFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTQS-TGGTAGTQQLLFSQAGPNNMSA	475
rh.74v1	NFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTQS-TGGTAGTQQLLFSQAGPNNMSA	475
rh.74v2	NFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTQS-TGGTAGTQQLLFSQAGPNNMSA	475
hu.12	TFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLNRTOGTTSGTTNQSRLLFQAGPMSV	472
hu.21	TFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTN-TPSGTTTMSRLQFSQAGASDIRD	472
hu.26	TFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTN-TPSGTTTMSRLQFSQAGASDIRD	472
hu.37	TFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTQS-TGGTQGTQQLLFSQAGPANMSA	475
hu.51	TFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSTTN-TPSGTTTQSRLLFSQAGASDIRD	472
hu.53	TFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLNRTO-TASGTQ-QSRLLFQAGPMSV	471

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

AAV1	QPKNWLPGPCYRQQRVSKTKTDNNNSNF-----TWTGASKYNLNGRESIINPGTAMASHK	528
AAV2	QSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSSEY-----SWTGATKYHLNGRDSLVPNGPAMASHK	527
AAV3	QARNWLPGPCYRQQRVSKTANDNNNSNF-----PWTAAASKYHLNGRDSLVPNGPAMASHK	528
AAV3-3	QARNWLPGPCYRQQRVSKTANDNNNSNF-----PWTAAASKYHLNGRDSLVPNGPAMASHK	528
AAV3B	QARNWLPGPCYRQQRVSKTANDNNNSNF-----PWTAAASKYHLNGRDSLVPNGPAMASHK	528
AAV4	FKKNWLPGPSIKQQGFSKTANQNYKIPATGSDSLIKYETHSTLDGRWSALTPGPPMATAG	527
AAV4-4	FKKNWLPGPSIKQQGFSKTANQNYKIPATGSDSLIKYETHSTLDGRWSALTPGPPMATAG	527
AAV5	TYKNWFPGPMGRTOGWNLGSVNRASVS-----AFATTNRMELEGASYQVPPQPNGMTNN	514
AAV6	QPKNWLPGPCYRQQRVSKTKTDNNNSNF-----TWTGASKYNLNGRESIINPGTAMASHK	528
AAV7	QAKNWLPGPCFRQQRVSKTLDQNNNSNF-----AWTGATKYHLNGRDSLVPNGVAMATHK	530
AAV8	QAKNWLPGPCYRQQRVSTTTGQNNNSNF-----AWTAGTKYHLNGRNSLANPGIAMATHK	530
AAV9	QGRNYIPGPSYRQQRVSTTTVQNNNSEF-----AWPGASSWALNGRNSLMNPGPAMASHK	528
AAV9e	QGRNYIPGPSYRQQRVSTTTVQNNNSEF-----AWPGASSWALNGRNSLMNPGPAMASHK	528
rh.10	QAKNWLPGPCYRQQRVSTTTLSQNNNSNF-----AWTGATKYHLNGRDSLVPNGVAMATHK	530
rh.20	QAKNWLPGPCYRQQRVSTTTLSQNNNSNF-----AWTGATKYHLNGRDSLVPNGVAMATHK	530
rh.39	QAKNWLPGPCYRQQRVSTTTLSQNNNSNF-----AWTGATKYHLNGRDSLVPNGVAMATHK	530
rh.73	QARNWLPGPCYRQQRVSTTTLSQNNNSNF-----AWTGATKYHLNGRDSLVPNGVAMATHK	530
rh.74v1	QAKNWLPGPCYRQQRVSTTTLSQNNNSNF-----AWTGATKYHLNGRDSLVPNGVAMATHK	530
rh.74v2	QAKNWLPGPCYRQQRVSTTTLSQNNNSNF-----AWTGATKYHLNGRDSLVPNGVAMATHK	530
hu.12	QAKNWLPGPCYRQQRVSKTANDNNNSNF-----PWTAAASKYHLNGRDSLVPNGPAMASHK	527
hu.21	QSRNWLPGPCYRQQRVSKTAAADNNNSDY-----SWTGATKYHLNGRDSLVPNGPAMASHK	527
hu.26	QSRNWLPGPCYRQQRVSKTAAADNNNSDY-----SWTGATKYHLNGRDSLVPNGPAMASHK	527
hu.37	QAKNWLPGPCYRQQRVSTTTLSQNNNSNF-----AWTGATKYHLNGRDSLVPNGVAMATHK	530
hu.51	QSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSSEY-----SWTGATKYHLNGRDSLVPNGPAMASHK	527
hu.53	QAKNWLPGPCYRQQRVSKTANDNNNSNF-----PWTGATKYHLNGRDSLVPNGPAMASHK	526

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

Фиг. 3 (продолжение)

AAV1	QILIKNTPVPANPPAEFSATKFFASFITQYSTGQVSVIEIWELOKENSKRWNPEVQYTSNY	705
AAV2	QILIKNTPVPANPSTTFSAAKFFASFITQYSTGQVSVIEIWELOKENSKRWNPEIQYTSNY	704
AAV3	QIMIKNTPVPANPPTTFSPAKFFASFITQYSTGQVSVIEIWELOKENSKRWNPEIQYTSNY	705
AAV3-3	QIMIKNTPVPANPPTTFSPAKFFASFITQYSTGQVSVIEIWELOKENSKRWNPEIQYTSNY	705
AAV3B	QIMIKNTPVPANPPTTFSPAKFFASFITQYSTGQVSVIEIWELOKENSKRWNPEIQYTSNY	705
AAV4	QIFIKNTPVPANPATTFSSTPVNSFITQYSTGQVSVQIDWEIQKERSKRWNPEVQFTSNY	703
AAV4-4	QIFIKNTPVPANPATTFSSTPVNSFITQYSTGQVSVQIDWEIQKERSKRWNPEVQFTSNY	703
AAV5	MMLIKNTPVPGNI-TSFSVDPVSSFITQYSTGQVTVEMEWELKENSKRWNPEIQYTNNY	693
AAV6	QILIKNTPVPANPPAEFSATKFFASFITQYSTGQVSVIEIWELOKENSKRWNPEVQYTSNY	705
AAV7	QILIKNTPVPANPPEVPTPAKFFASFITQYSTGQVSVIEIWELOKENSKRWNPEIQYTSNF	706
AAV8	QILIKNTPVPADPPTTFNQSKLNSFITQYSTGQVSVIEIWELOKENSKRWNPEIQYTSNY	707
AAV9	QILIKNTPVPADPPTAFNKDKLNSFITQYSTGQVSVIEIWELOKENSKRWNPEIQYTSNY	705
AAV9e	QILIKNTPVPADPPTAFNKDKLNSFITQYSTGQVSVIEIWELOKENSKRWNPEIQYTSNY	705
rh.10	QILIKNTPVPADPPTTFSQAKLASFITQYSTGQVSVIEIWELOKENSKRWNPEIQYTSNY	707
rh.20	QILIKNTPVPADPPTTFSQAKLASFITQYSTGQVSVIEIWELOKENSKRWNPEIQYTSNY	707
rh.39	QILIKNTPVPADPPTTFSQAKLASFITQYSTGQVSVIEIWELOKENSKRWNPEIQYTSNY	707
rh.73	QILIKNTPVPADPPTAFNQAKLNSFITQYSTGQVSVIEIWELOKENSKRWNPEIQYTSNY	707
rh.74v1	QILIKNTPVPADPPTTFKAKLASFITQYSTGQVSVIEIWELOKENSKRWNPEIQYTSNY	707
rh.74v2	QILIKNTPVPADPPTTFNQAKLASFITQYSTGQVSVIEIWELOKENSKRWNPEIQYTSNY	707
hu.12	QIMIKNTPVPANPPTNFSSAKFFASFITQYSTGQVSVIEIWELOKENSKRWNPEIQYTSNY	704
rh.21	QILIKNTPVPANPSTTFSAAKFFASFITQYSTGQVSVIEIWELOKENSKRWNPEIQYTSNY	704
hu.26	QILIKNTPVPANPSTTFSAAKFFASFITQYSTGQVSVIEIWELOKENSKRWNPEIQYTSNY	704
hu.37	QILIKNTPVPADPPTTFSQAKLASFITQYSTGQVSVIEIWELOKENSKRWNPEIQYTSNY	707
hu.51	QILIKNTPVPANPSTTFSAAKFFASFITQYSTGQVSVIEIWELOKENSKRWNPEIQYTSNY	705
hu.53	QIMIKNTPVPANPPTNFSSAKFFASFITQYSTGQVSVIEIWELOKENSKRWNPEIQYTSNY	704
	:*****.: * . *****:***:**:**:**:**:**:**:**:**:**:**:	

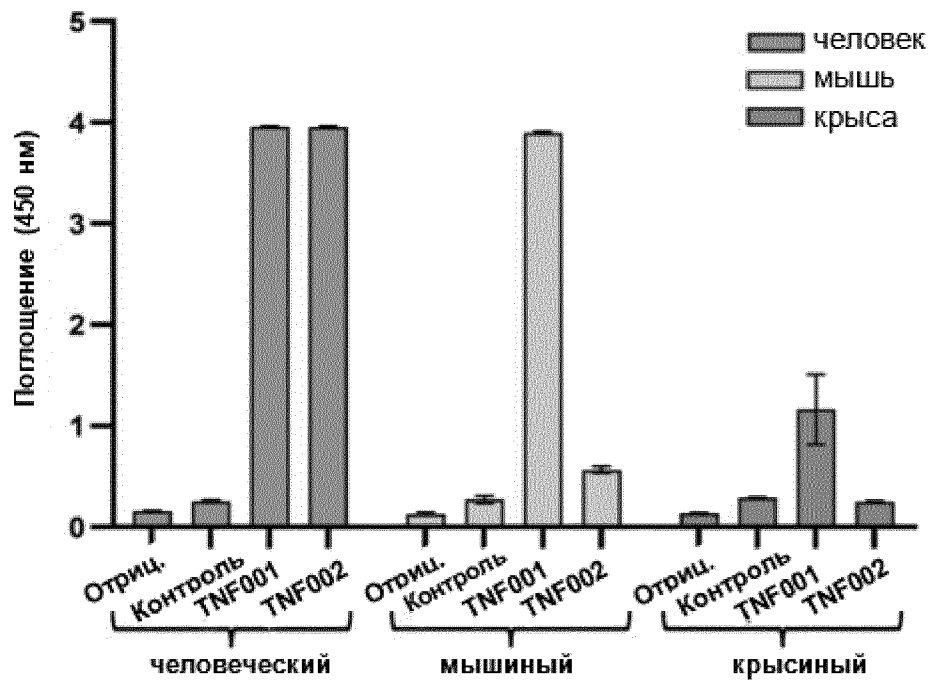
AAV1	AKSANVDFTVDNNGLYTEPRPIGTRYLTRPL	736	(SEQ ID NO:22)
AAV2	NKSVNVDFTVDINGVYSEPRPIGTRYLTRNL	735	(SEQ ID NO:23)
AAV3	NKSVNVDFTVDINGVYSEPRPIGTRYLTRNL	736	(SEQ ID NO:24)
AAV3-3	NKSVNVDFTVDINGVYSEPRPIGTRYLTRNL	736	(SEQ ID NO:25)
AAV3B	NKSVNVDFTVDINGVYSEPRPIGTRYLTRNL	736	(SEQ ID NO:26)
AAV4	GQONSLWAPDAAGKYTEPRAIGTRYLTHHL	734	(SEQ ID NO:27)
AAV4-4	GQONSLWAPDAAGKYTEPRAIGTRYLTHHL	734	(SEQ ID NO:28)
AAV5	NDPQFVDFAPDSTGEYRTRTRPIGTRYLTRPL	724	(SEQ ID NO:29)
AAV6	AKSANVDFTVDNNGLYTEPRPIGTRYLTRPL	736	(SEQ ID NO:30)
AAV7	EKQGTGVDFAVDSQGVYSEPRPIGTRYLTRNL	737	(SEQ ID NO:31)
AAV8	YKSTSVDFAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL	738	(SEQ ID NO:32)
AAV9	YKSNNVEFAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL	736	(SEQ ID NO:33)
AAV9e	YKSNNVEFAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL	736	(SEQ ID NO:34)
rh.10	YKSTNVDFAVNTDGTYSERPIGTRYLTRNL	738	(SEQ ID NO:35)
rh.20	YKSTNVDFAVNTEGTYSERPIGTRYLTRNL	738	(SEQ ID NO:36)
rh.39	YKSTNVDFAVNTEGTYSERPIGTRYLTRNL	738	(SEQ ID NO:37)
rh.73	YKSTNVDFAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL	739	(SEQ ID NO:38)
rh.74v1	YKSTNVDFAVNTEGTYSERPIGTRYLTRNL	738	(SEQ ID NO:39)
rh.74v2	YKSTNVDFAVNTEGTYSERPIGTRYLTRNL	738	(SEQ ID NO:40)
hu.12	NKSVNVDFTVDINGVYSEPRPIGTRYLTRNL	735	(SEQ ID NO:41)
hu.21	NKSVNVDFTVDINGVYSEPRPIGTRYLTRNL	735	(SEQ ID NO:42)
hu.26	NKSVNVDFTVDINGVYSEPRPIGTRYLTRNL	735	(SEQ ID NO:43)
hu.37	YKSTNVDFAVNTEGTYSERPIGTRYLTRNL	738	(SEQ ID NO:44)
hu.51	NKSVNVDFTVDINGVYSEPRPIGTRYLTRNL	736	(SEQ ID NO:45)
hu.53	NKSVNVDFTVDINGVYSEPRPIGTRYLTRNL	737	(SEQ ID NO:46)
	. : : * * * *****: *		

Фиг. 4

IgG1	EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK	274
IgG2	E---RKCCVECPPCPAPPV-AGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQ	274
IgG4	E---SKYGPPCPCSPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQ	274
	* : ** **** . *****:*****:	
IgG1	FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK	334
IgG2	FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEK	334
IgG4	FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK	334
	*****:***:*****:*****:***:***	
IgG1	TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT	394
IgG2	TISKTKGQPREPQVYTLPPSRREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDISVEWESNGQPENNYKTT	394
IgG4	TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT	394
	:**:***:*****:*****:*****	
IgG1	PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	447 (SEQ ID NO:47)
IgG2	PPMLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	447 (SEQ ID NO:48)
IgG4	PPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	447 (SEQ ID NO:49)
	** : *****:*****:*****:*****:***	

Фиг. 5А и В

А.



В.

