

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202391634** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.09.14

(22) Дата подачи заявки
2021.11.30

(51) Int. Cl. *A61P 27/16* (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 9/08 (2006.01)
A61K 9/19 (2006.01)
A61K 9/51 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
C07K 16/22 (2006.01)

(54) КОНСТРУКЦИИ НА ОСНОВЕ АНТИТЕЛ К VEGF И СООТВЕТСТВУЮЩИЕ СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ СИМПТОМОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ВЕСТИБУЛЯРНОЙ ШВАННОМНОЙ

(31) 63/120,189; 63/152,832

(32) 2020.12.01; 2021.02.23

(33) US

(86) PCT/US2021/061205

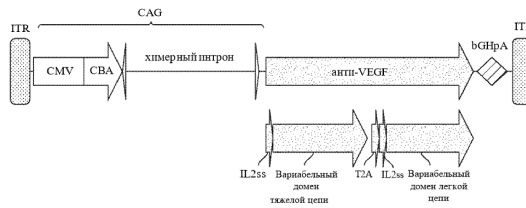
(87) WO 2022/119839 2022.06.09

(71) Заявитель:
АКУОС, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Саймонс Эммануэль Джон, Нг Роберт,
Маккенна Майкл (US)

(74) Представитель:
Гизатуллин Ш.Ф., Гизатуллина
Е.М., Угрюмов В.М., Строкова О.В.,
Джермакян Р.В., Костюшенкова М.Ю.
(RU)

(57) В настоящем изобретении предложена конструкция, содержащая кодирующую последовательность, функционально связанную с промотором, причем кодирующая последовательность кодирует агент, связывающий фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), или его часть. В некоторых вариантах осуществления конструкция представляет собой конструкцию AAV. В некоторых вариантах осуществления конструкция AAV представляет собой часть частицы AAV. Композиции, содержащие конструкции и частицы AAV, описанные в данном документе, могут быть применимы при лечении потери слуха, например потери слуха, ассоциированной с вестибулярной шванномой.



A1

202391634

202391634

A1

КОНСТРУКЦИИ НА ОСНОВЕ АНТИТЕЛ К VEGF И СООТВЕТСТВУЮЩИЕ СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ СИМПТОМОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ВЕСТИБУЛЯРНОЙ ШВАННОМой

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] В данной заявке испрашивается приоритет по предварительной заявке США 63/120 189, поданной 1 декабря 2020 г. и 63/152 832, поданной 23 февраля 2021 г., полное содержание каждой из которой включено в данный документ посредством ссылки.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0002] Данная заявка содержит перечень последовательностей, который был подан в электронной виде в формате ASCII и полностью включен в данный документ посредством ссылки. Копия указанного перечня в формате ASCII, созданная 19 ноября 2021 г., имеет название 2013615-0503_(AK020_WO)_SL.txt и размер 328 540 байт.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0003] Потеря слуха может быть кондуктивной (возникающей в слуховом проходе или среднем ухе), нейросенсорной (возникающей во внутреннем ухе или слуховом нерве) или смешанной. Нейросенсорная тугоухость включает потерю слуха, вызванную нарушением работы клеток (например, волосковых клеток) во внутреннем ухе млекопитающего. Неограничивающие причины нейросенсорной тугоухости включают воздействие громкого шума, травму головы, вирусную инфекцию, аутоиммунное заболевание внутреннего уха, генетическую тугоухость, старение, пороки развития внутреннего уха, болезнь Меньера, отосклероз и опухоли. Как уже обсуждалось в данном документе, другой причиной потери слуха может быть вестибулярная шваннома (ВШ), которая представляет собой, например, опухоль, развивающуюся на нервах, проходящих от внутреннего уха к головному мозгу.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0004] В данном изобретении признается, что введение субъекту анти-VEGF белков (например, ранибизумаба, бевацизумаба и/или афлиберцепта) может быть применимо для лечения состояний, заболеваний или нарушений, ассоциированных с неоваскуляризацией. В данном изобретении признается, что введение субъекту анти-VEGF белков не всегда является простой задачей. Например, введение анти-VEGF белков должно осуществляться

таким образом, чтобы обеспечить надлежащие уровни анти-VEGF белков локально в клетках и тканях, ассоциированных с неоваскуляризацией.

[0005] В данном изобретении предусмотрено, что применение анти-VEGF конструкций, которые могут экспрессировать анти-VEGF белки (например, ранибизумаб, бевацизумаб и/или афлиберцепт), может быть применимо для лечения состояний, заболеваний или нарушений, ассоциированных с неоваскуляризацией. В частности, конструкции на основе рекомбинантных AAV (rAAV), кодирующие анти-VEGF белки (например, ранибизумаб, бевацизумаб и/или афлиберцепт), могут быть особенно применимы для лечения состояний, заболеваний или нарушений, ассоциированных с неоваскуляризацией в ушах и глазах, в частности, при их применении с капсидом rAAVAnc80 для формирования частицы rAAVAnc80-анти-VEGF.

[0006] Среди прочего, в данном изобретении предложена конструкция, содержащая кодирующую последовательность, функционально связанную с промотором, причем кодирующая последовательность кодирует агент, связывающий фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) или его часть (также именуемые в данном документе при совместном упоминании анти-VEGF белком).

[0007] В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой индуцибельный промотор, конститутивный промотор или тканеспецифичный промотор. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой промотор CAG, промотор CBA, промотор CMV или промотор CB7. В некоторых вариантах осуществления промотор содержит последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 49 или 50, SEQ ID NO: 64 и/или SEQ ID NO: 65.

[0008] В некоторых вариантах осуществления кодирующая последовательность представляет собой или включает кодирующую последовательность примата. В некоторых вариантах осуществления кодирующая последовательность представляет собой или включает кодирующую последовательность человека. В некоторых вариантах осуществления кодирующая последовательность представляет собой или включает сконструированную кодирующую последовательность.

[0009] В некоторых вариантах осуществления VEGF-связывающий агент или его часть представляет собой VEGF-связывающий агент примата. В некоторых вариантах осуществления VEGF-связывающий агент представляет собой или включает VEGF-связывающий агент человека. В некоторых вариантах осуществления VEGF-связывающий агент представляет собой или включает гуманизированный VEGF-связывающий агент.

[0010] В некоторых вариантах осуществления VEGF-связывающий агент способен связываться с по меньшей мере одним белком VEGF. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один белок VEGF представляет собой VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один белок VEGF представляет собой VEGF-A.

[0011] В некоторых вариантах осуществления VEGF-связывающий агент содержит по меньшей мере один полипептид. В некоторых вариантах осуществления VEGF-связывающий агент представляет собой или включает антитело или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления фрагмент антитела представляет собой фрагмент Fab, фрагмент Fab', фрагмент F(ab')₂, фрагмент Fd, фрагмент Fd', определяющую комплементарную область (CDR), одноцепочечный Fv или домен Fc. В некоторых вариантах осуществления VEGF-связывающий агент представляет собой или включает тяжелую цепь иммуноглобулина, легкую цепь иммуноглобулина или их комбинацию.

[0012] В некоторых вариантах осуществления VEGF-связывающий агент содержит полипептид, содержащий аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 16. В некоторых вариантах осуществления VEGF-связывающий агент содержит полипептид, содержащий аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления VEGF-связывающий агент содержит полипептид, содержащий полипептид, содержащий аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 16 и полипептид, содержащий аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 20.

[0013] В некоторых вариантах осуществления VEGF-связывающий агент представляет собой или включает ранибизумаб.

[0014] В некоторых вариантах осуществления кодирующая последовательность включает последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления кодирующая последовательность включает последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления кодирующая последовательность содержит последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 13 и последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 19.

[0015] В некоторых вариантах осуществления кодирующая последовательность представляет собой или включает последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 103.

[0016] В некоторых вариантах осуществления VEGF-связывающий агент содержит полипептид, содержащий аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 24. В некоторых вариантах осуществления VEGF-связывающий агент содержит полипептид, содержащий аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 25. В некоторых вариантах осуществления VEGF-связывающий агент содержит полипептид, содержащий аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 24 и полипептид, содержащий аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 25.

[0017] В некоторых вариантах осуществления VEGF-связывающий агент представляет собой или включает бевацизумаб.

[0018] В некоторых вариантах осуществления кодирующая последовательность включает последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 108. В некоторых вариантах осуществления кодирующая последовательность включает последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 109. В некоторых вариантах осуществления кодирующая последовательность включает последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 108 и аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 109.

[0019] В некоторых вариантах осуществления кодирующая последовательность представляет собой или включает последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 22.

[0020] В некоторых вариантах осуществления кодирующая последовательность включает одну или более последовательностей нуклеиновых кислот, каждая из которых кодирует сигнальный пептид. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна последовательность нуклеиновой кислоты кодирует сигнальный пептид интерлейкина 2 (IL2).

[0021] В некоторых вариантах осуществления кодирующая последовательность включает одну или несколько последовательностей, кодирующих саморасщепляющийся пептид. В некоторых вариантах осуществления саморасщепляющийся пептид представляет собой пептид 2A вируса *Thossea asigna* (T2A).

[0022] В некоторых вариантах осуществления VEGF-связывающий агент содержит домен Fc. В некоторых вариантах осуществления изобретения домен Fc содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 111.

[0023] В некоторых вариантах осуществления кодирующая последовательность включает последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 110.

[0024] В некоторых вариантах осуществления VEGF-связывающий агент содержит один или более внеклеточных доменов рецепторов VEGF. В некоторых вариантах осуществления один или более внеклеточных доменов рецепторов VEGF включают внеклеточный домен, содержащий аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 112.

[0025] В некоторых вариантах осуществления VEGF-связывающий агент содержит два внеклеточных домена рецепторов VEGF.

[0026] В некоторых вариантах осуществления кодирующая последовательность включает одну или более последовательностей нуклеиновых кислот, каждая из которых кодирует сигнальный пептид. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна последовательность нуклеиновой кислоты кодирует сигнальный пептид IL2.

[0027] В некоторых вариантах осуществления конструкция содержит два инвертированных концевых повтора (ITR) AAV. В некоторых вариантах осуществления два ITR AAV фланкируют кодирующую последовательность и промотор.

[0028] В некоторых вариантах осуществления два ITR AAV являются ITR AAV2 или их производными.

[0029] В некоторых вариантах осуществления два ITR AAV содержат 5'-ITR, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 45 или 47, и 3'-ITR, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 46 или 48.

[0030] В некоторых вариантах осуществления конструкция содержит последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с любой из SEQ ID NO: 90, 91, 92, 93, 94, 106 или 107.

[0031] В некоторых вариантах осуществления конструкция содержит последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с любой из SEQ ID NO: 95 или 96.

[0032] В некоторых вариантах осуществления описанная в данном документе конструкция предназначена для лечения отологического заболевания, характеризующегося неоваскуляризацией и/или одним или более симптомами, ассоциированными с отологическим заболеванием. В некоторых вариантах осуществления предложено

применение описанной в данном документе конструкции для производства лекарственного средства для лечения отологического заболевания, характеризующегося неоваскуляризацией и/или одним или более симптомами, ассоциированными с отологическим заболеванием. В некоторых вариантах осуществления один или более симптомов, ассоциированных с отологическим заболеванием, включают потерю слуха, дегенерацию волосковых клеток, изменение биохимического состава жидкостей внутреннего уха, повышенный уровень внутрилабиринтного белка, эндолимфатический гидропс, обструкцию улиткового отверстия, внутрилабиринтное кровоизлияние, нарушение кровоснабжения улитки, шум в ушах, головокружение, некупируемую головную боль, невралгию лицевого нерва, невралгия тройничного нерва, паралич лицевого нерва, парестезию лицевого нерва, гидроцефалию, грыжу мозжечка или летальный исход.

[0033] В данном раскрытии также предложена частица AAV, содержащая конструкцию, описанную в данном документе.

[0034] В некоторых вариантах осуществления частица гAAV содержит капсид гAAV, причем капсид гAAV представляет собой или получен из капсида AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV-rh8, AAV-rh10, AAV-rh39, AAV-rh43 или AAV Anc80. В некоторых вариантах осуществления капсид гAAV представляет собой капсид гAAV Anc80. В некоторых вариантах осуществления капсид гAAV Anc80 представляет собой капсид гAAV Anc80L65.

[0035] В некоторых вариантах осуществления частица AAV, описанная в данном документе предназначена для лечения отологического заболевания, характеризующегося неоваскуляризацией и/или одним или более симптомами, ассоциированными с отологическим заболеванием. В некоторых вариантах осуществления применение частицы AAV, как описано в данном документе, для производства лекарственного средства для лечения отологического заболевания, характеризующегося неоваскуляризацией и/или одним или более симптомами, ассоциированными с отологическим заболеванием. В некоторых вариантах осуществления один или более симптомов, ассоциированных с отологическим заболеванием, включают потерю слуха, дегенерацию волосковых клеток, изменение биохимического состава жидкостей внутреннего уха, повышенный уровень внутрилабиринтного белка, эндолимфатический гидропс, обструкцию улиткового отверстия, внутрилабиринтное кровоизлияние, нарушение кровоснабжения улитки, шум в ушах, головокружение, некупируемую головную боль, невралгию лицевого нерва, невралгия тройничного нерва, паралич лицевого нерва, парестезию лицевого нерва,

гидроцефалию, грыжу мозжечка или летальный исход.

[0036] В настоящем изобретении предложена композиция, содержащая конструкцию, описанную в данном документе, и/или частицу AAV, описанную в данном документе.

[0037] В некоторых вариантах осуществления композиция представляет собой фармацевтическую композицию. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит фармацевтически приемлемый носитель.

[0038] В некоторых вариантах осуществления композицию (например, фармацевтическую композицию), содержащую частицу AAV, описанную в данном документе, например, частицу гAAV-анти-VEGF, вводят в дозе (например, количестве) от около 1×10^{11} вг/мл до около 1×10^{15} вг/мл. В некоторых вариантах осуществления композицию (например, фармацевтическую композицию), содержащую частицу AAV, описанную в данном документе, например, частицу гAAV-анти-VEGF, вводят в дозе (например, количестве) $2,5 \times 10^{12}$ вг/мл +/- 10%. В некоторых вариантах осуществления композицию (например, фармацевтическую композицию), содержащую частицу AAV, описанную в данном документе, например, частицу гAAV-анти-VEGF, вводят в дозе (например, количестве) 5×10^{12} вг/мл +/- 10%. В некоторых вариантах осуществления композицию (например, фармацевтическую композицию), содержащую частицу AAV, описанную в данном документе, например, частицу гAAV-анти-VEGF, вводят в дозе (например, количестве) 1×10^{13} вг/мл +/- 10%.

[0039] В некоторых вариантах осуществления композицию (например, фармацевтическую композицию), содержащую частицу AAV, описанную в данном документе, например, частицу гAAV-анти-VEGF, вводят в дозе от около 1×10^{10} до около 1×10^{13} вг/улитку. В некоторых вариантах осуществления композицию (например, фармацевтическую композицию), содержащую частицу AAV, описанную в данном документе, например, частицу гAAV-анти-VEGF, вводят в дозе около $2,3 \times 10^{11}$ вг/улитку. В некоторых вариантах осуществления композицию (например, фармацевтическую композицию), содержащую частицу AAV, описанную в данном документе, например, частицу гAAV-анти-VEGF, вводят в дозе около $4,5 \times 10^{11}$ вг/улитку. В некоторых вариантах осуществления композицию (например, фармацевтическую композицию), содержащую частицу AAV, описанную в данном документе, например, частицу гAAV-анти-VEGF, вводят в дозе около 9×10^{11} вг/улитку.

[0040] В некоторых вариантах осуществления композицию (например, фармацевтическую композицию), содержащую частицу AAV, описанную в данном

документе, например, частицу гAAV-анти-VEGF, вводят субъекту в объема от около 0,01 мл до 0,1 мл. В некоторых вариантах осуществления композицию (например, фармацевтическую композицию), содержащую частицу AAV, описанную в данном документе, например, частицу гAAV-анти-VEGF, вводят субъекту в объеме около 0,09 мл.

[0041] В некоторых вариантах осуществления описанная в данном документе композиция предназначена для лечения отологического заболевания, например, у млекопитающего, у которого отологическое заболевание характеризуется неоваскуляризацией и/или одним или более симптомами, ассоциированными с отологическим заболеванием. В некоторых вариантах осуществления предложено применение описанной в данном документе конструкции для производства лекарственного средства для лечения отологического заболевания, например, у млекопитающего, у которого отологическое заболевание характеризуется неоваскуляризацией и/или одним или более симптомами, ассоциированными с отологическим заболеванием. В некоторых вариантах осуществления один или более симптомов, ассоциированных с отологическим заболеванием, включают потерю слуха, дегенерацию волосковых клеток, изменение биохимического состава жидкостей внутреннего уха, повышенный уровень внутрилабиринтного белка, эндолимфатический гидропс, обструкцию улиткового отверстия, внутрилабиринтное кровоизлияние, нарушение кровоснабжения улитки, шум в ушах, головокружение, некупируемую головную боль, невропатию лицевого нерва, невропатию тройничного нерва, паралич лицевого нерва, парестезию лицевого нерва, гидроцефалию, грыжу мозжечка, летальный исход или их комбинацию.

[0042] В некоторых вариантах осуществления описанная в данном документе композиция предназначена для лечения заболеваний внутреннего уха, например, у млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления предложено применение описанной в данном документе конструкции для производства лекарственного средства для лечения заболевания внутреннего уха, например, у млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления заболевание внутреннего уха включает акустическую неврому, вестибулярную шванному или нейрофиброматоз II типа. В некоторых вариантах осуществления заболевание внутреннего уха представляет собой или включает акустическую неврому. В некоторых вариантах осуществления заболевание внутреннего уха представляет собой или включает вестибулярную шванному. В некоторых вариантах осуществления заболевание внутреннего уха представляет собой или включает нейрофиброматоз II типа.

[0043] В некоторых вариантах осуществления описанная в данном документе

композиция предназначена для лечения вестибулярной шванномы, например, у млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления предложено применение описанной в данном документе конструкции для производства лекарственного средства для лечения вестибулярной шванномы, например, у млекопитающего.

[0044] В некоторых вариантах осуществления любого из способов или применений, раскрытых в данном документе, млекопитающим является человек.

[0045] В настоящем изобретении также представлена клетка. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит конструкцию, описанную в данном документе, частицу гAAV, описанную в данном документе, и/или композицию, описанную в данном документе.

[0046] В некоторых вариантах осуществления клетка находится *in vivo*, *ex vivo* или *in vitro*.

[0047] В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой клетку млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой клетку человека. В некоторых вариантах осуществления клетка человека находится в ухе субъекта.

[0048] В некоторых вариантах осуществления клетку иммортализируют для получения стабильной клеточной линии.

[0049] В настоящем изобретении представлена система. Система включает конструкцию, описанную в данном документе, частицу гAAV, описанную в данном документе, композицию, описанную в данном документе, и/или клетку, описанную в данном документе.

[0050] В настоящем изобретении представлен способ. В некоторых вариантах осуществления способ включает приведение клетки в контакт с конструкцией, описанной в данном документе, частицей гAAV, описанной в данном документе, и/или композицией, описанной в данном документе.

[0051] В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой клетку субъекта.

[0052] В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой клетку уха. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой клетку внутреннего уха. В некоторых вариантах осуществления клетка внутреннего уха представляет собой наружную волосковую клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка внутреннего уха представляет собой внутреннюю волосковую клетку.

[0053] В некоторых вариантах осуществления клетка внутреннего уха находится *in vitro*

или *ex vivo*.

[0054] В некоторых вариантах осуществления способ включает введение во внутреннее ухо субъекта конструкции, описанной в данном документе, частицы гAAV, описанной в данном документе, и/или композиции, описанной в данном документе.

[0055] В некоторых вариантах осуществления конструкцию, частицу гAAV или композицию вводят в улитку субъекта. В некоторых вариантах осуществления конструкцию, частицу гAAV или композицию вводят посредством инъекции в мембрану круглого окна.

[0056] В некоторых вариантах осуществления способ включает измерение уровня слуха субъекта. В некоторых вариантах осуществления уровень слуха измеряют путем исследования акустических стволовых вызванных потенциалов (ABR).

[0057] В некоторых вариантах осуществления способ включает сравнение уровня слуха субъекта с эталонным уровнем слуха. В некоторых вариантах осуществления эталонный уровень слуха представляет собой опубликованный или исторический эталонный уровень слуха.

[0058] В некоторых вариантах осуществления уровень слуха субъекта измеряют после введения конструкции, описанной в данном документе, частицы гAAV, описанной в данном документе, и/или композиции, описанной в данном документе, а эталонный уровень слуха представляет собой уровень слуха субъекта, который измеряли перед введением конструкции, описанной в данном документе, частицы гAAV, описанной в данном документе, и/или композиции, описанной в данном документе.

[0059] В некоторых вариантах осуществления способ включает измерение уровня агента, связывающего фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), или его части у субъекта.

[0060] В некоторых вариантах осуществления уровень агента, связывающего фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), или его части измеряют во внутреннем ухе субъекта. В некоторых вариантах осуществления уровень агента, связывающего фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), или его части измеряют в улитке субъекта.

[0061] В некоторых вариантах осуществления способ включает сравнение уровня агента, связывающего фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), или его части у субъекта с эталонным уровнем агента, связывающего фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), или его части.

[0062] В некоторых вариантах осуществления эталонный уровень агента,

связывающего фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), или его части представляет собой опубликованный или исторический эталонный уровень агента, связывающего фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) или его часть.

[0063] В некоторых вариантах осуществления уровень агента, связывающего фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), или его часть у субъекта измеряют после введения конструкции, описанной в данном документе, частицы AAV, описанной в данном документе, и/или композиции, описанной в данном документе, а эталонный уровень агента, связывающего фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), или его части представляет собой уровень агента, связывающего фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), или его части у субъекта, который был измерен перед введением конструкции, описанной в данном документе, частицы AAV, описанной в данном документе, и/или композиции, описанной в данном документе.

[0064] В некоторых вариантах осуществления способ включает измерение размера или объема опухоли у субъекта. В некоторых вариантах осуществления размер представляет собой максимальный диаметр или длину опухоли.

[0065] В некоторых вариантах осуществления способ включает сравнение размера или объема опухоли у субъекта с эталонным размером или объемом опухоли, соответственно.

[0066] В некоторых вариантах осуществления эталонный размер или объем опухоли представляет собой опубликованный или исторический эталонный размер или объем опухоли.

[0067] В некоторых вариантах осуществления размер или объем опухоли у субъекта измеряют после введения конструкции, описанной в данном документе, частицы AAV, описанной в данном документе, и/или композиции, описанной в данном документе, а эталонный размер или объем опухоли представляет собой размер или объем опухоли у субъекта, которые были измерены до введения конструкции, описанной в данном документе, частицы AAV, описанной в данном документе, и/или композиции, описанной в данном документе.

[0068] В некоторых вариантах осуществления способ представляет собой способ лечения потери слуха, включающий введение конструкции, описанной в данном документе, частицы gAAV, описанной в данном документе, и/или композиции, описанной в данном документе, нуждающемуся в этом субъекту.

[0069] В некоторых вариантах осуществления субъект страдает отологическим

заболеванием, характеризующимся неоваскуляризацией, или подвержен риску развития такого заболевания. В некоторых вариантах осуществления отологическое заболевание представляет собой или включает акустическую неврому. В некоторых вариантах осуществления отологическое заболевание представляет собой или включает вестибулярную шванному.

[0070] В некоторых вариантах осуществления способ представляет собой способ лечения заболевания внутреннего уха, включающий введение конструкции, описанной в данном документе, частицы гAAV, описанной в данном документе, и/или композиции, описанной в данном документе, нуждающемуся в этом субъекту. В некоторых вариантах осуществления заболевание внутреннего уха представляет собой акустическую неврому, вестибулярную шванному или нейрофиброматоз II типа.

[0071] В некоторых вариантах осуществления любого из способов или применений, раскрытых в данном документе, субъект является человеком.

[0072] В некоторых вариантах осуществления один или более симптомов, ассоциированных с отологическим заболеванием, облегчаются или ослабевают после введения конструкции, описанной в данном документе, частицы AAV, описанной в данном документе, и/или композиции, описанной в данном документе. В некоторых вариантах осуществления один или более симптомов включают потерю слуха, дегенерацию волосковых клеток, изменение биохимического состава жидкостей внутреннего уха, повышенный уровень внутрилабиринтного белка, эндолимфатический гидропс, обструкцию улиткового отверстия, внутрилабиринтное кровоизлияние, нарушение кровоснабжения улитки, шум в ушах, головокружение, некупируемую головную боль, невралгию лицевого нерва, невралгия тройничного нерва, паралич лицевого нерва, парестезию лицевого нерва, гидроцефалию, грыжу мозжечка или летальный исход.

[0073] В некоторых вариантах осуществления способ представляет собой способ лечения вестибулярной шванномы.

[0074] В некоторых вариантах осуществления способ представляет собой способ модулирования уровня VEGF.

[0075] В некоторых вариантах осуществления способ представляет собой способ модулирования уровня активного VEGF.

[0076] В некоторых вариантах осуществления способ представляет собой способ снижения активности VEGF.

[0077] В настоящем изобретении предложен способ, включающий приведение клетки в контакт с конструкцией, описанной в данном документе, и одной или более конструкциями, содержащими ген Rep AAV, ген Cap AAV, ген VA AAV, ген E2a AAV и ген E4 AAV.

[0078] В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой клетку внутреннего уха. В некоторых вариантах осуществления клетка внутреннего уха представляет собой наружную волосковую клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка внутреннего уха представляет собой внутреннюю волосковую клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка внутреннего уха находится в ухе субъекта. В некоторых вариантах осуществления клетка внутреннего уха находится *in vitro* или *ex vivo*.

[0079] В данном изобретении предложена популяция клеток, включающая одну или более клеток, описанных в данном документе, причем популяция представляет собой или включает в себя стабильную линию клеток.

[0080] В данном документе описаны способы и материалы для применения в данном изобретении; также могут быть использованы другие подходящие способы и материалы, известные в данной области техники. Материалы, способы и примеры являются иллюстративными и не носят ограничительного характера. Все публикации, заявки на патенты, патенты, последовательности, записи в базе данных и другие ссылки, упомянутые в данном документе, полностью включены в данный документ посредством ссылки. В случае конфликта данное описание, включая определения, является преваляющим.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

[0081] Объем настоящего раскрытия определяется прилагаемой формулой изобретения и не ограничивается определенными вариантами осуществления, описанными в данном документе. Специалистам в данной области техники, читающим настоящее описание, будут известны различные модификации, которые могут быть эквивалентны таким описанным вариантам осуществления или иным образом входить в объем формулы изобретения. В общем, используемые в данном документе термины соответствуют их понимаемому значению в данной области техники, если не указано иное. Явные определения определенных терминов приведены ниже; значения этих и других терминов в конкретных случаях в данном описании будут понятны специалистам в данной области из контекста.

[0082] Использование в формуле изобретения порядковых терминов, таких как

«первый», «второй», «третий» и т. д., для модификации элемента пункта формулы изобретения само по себе не подразумевает какого-либо приоритета, первоочередности или порядка одного элемента формулы изобретения относительно другого или временного порядка, в котором проводятся действия для осуществления способа, но они используются исключительно как метки для отличия одного элемента формулы изобретения, имеющего определенное название, от другого элемента, имеющего такое же название (за исключением использования порядкового термина), для отличия элементов формулы изобретения.

[0083] Упоминания единственного числа данным документе следует понимать как включающие множественное число, если явно не указано иное. Формула изобретения или описания, которые включают «или» между одним или большим количеством представителей группы, считаются удовлетворенными, если один, несколько или все представители группы присутствуют, применяются или иным образом относятся к данному продукту или процессу, если не указано иное или иным образом не следует из контекста. В некоторых вариантах осуществления ровно один член группы присутствует в, применяется в или иным образом относится к данному продукту или способу. В некоторых вариантах осуществления более чем один или все из группы членов присутствуют в, применяются в или иным образом относятся к данному продукту или способу. Следует понимать, что настоящее раскрытие охватывает все варианты, комбинации и перестановки, в которых одно или несколько ограничений, элементов, положений, описательных терминов и т. д. одного или нескольких из перечисленных пунктов формулы изобретения вводятся в другой пункт формулы настоящему изобретению зависимый от того же независимого пункта (или, если применимо, любого другого пункта), если не указано иное, или если специалисту в данной области техники не будет очевидно потенциальное противоречие или несоответствие. Когда элементы представлены в виде списков (например, в формате группы Маркуша или схожих форматах), следует понимать, что каждая подгруппа элементов также раскрывается, и любой элемент (элементы) можно удалить из группы. Следует понимать, что, в общем, когда варианты осуществления или аспекты упоминаются как «содержащие» конкретные элементы, признаки и т. д. определенные варианты осуществления или аспекты «состоят» или «состоят по существу из» таких элементов, признаков и т. д. В целях упрощения такие варианты осуществления не во всех случаях конкретно изложены в данном документе в таком количестве слов. Следует также понимать, что любой вариант осуществления или аспект могут быть явно исключены из формулы изобретения, независимо от того, указано ли конкретное исключение в описании.

[0084] Во всем описании, когда полинуклеотид или полипептид представлен

последовательностью букв (например, А, С, G и Т, которые обозначают аденозин, цитидин, гуанозин и тимидин, соответственно, в случае полинуклеотида), такие полинуклеотиды или полипептиды представлены в порядке от 5`-фосфорамидитных связей к 3`-фосфорамидитных связей или от N-конца к С-концу слева направо.

[0085] *Введение.* В контексте данного документа термин «введение», как правило, относится к введению композиции субъекту или системе для достижения доставки агента субъекту или системе. В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой композицию или включен в нее; в некоторых вариантах осуществления агент образуется в результате метаболизма композиции или одного или более ее компонентов. Специалистам в данной области известно множество путей, которые, при соответствующих обстоятельствах, могут быть использованы для введения субъекту, например, человеку. Например, в некоторых вариантах осуществления введение может быть систематическим или местным. В некоторых вариантах осуществления системное введение может быть внутривенным. В некоторых вариантах осуществления введение может быть местным. Местное введение может включать доставку к перилимфе улитки посредством, например, инъекции через мембрану круглого окна или в барабанную лестницу, инъекции в канал улитки через эндолимфу, перилимфу и/или эндолимфу после каналостомии. В некоторых вариантах осуществления введение может включать только однократную дозу. В некоторых вариантах осуществления введение может включать применение фиксированного количества доз. В некоторых вариантах осуществления введение может включать дробное введение (например, множество доз, разделенных во времени) и/или периодическое введение (например, индивидуальные дозы, разделенные общим периодом времени). В некоторых вариантах осуществления введение может включать непрерывное введение (например, перфузию) в течение по меньшей мере выбранного периода времени.

[0086] *Аллель.* В контексте данного документа термин «аллель» относится к одному из двух или более существующих генетических вариантов конкретного полиморфного геномного локуса.

[0087] *Улучшение.* В контексте данного документа термин «улучшение» относится к предотвращению, уменьшению или смягчению состояния или улучшению состояния субъекта. Улучшение может включать полное выздоровление или полное предотвращение заболевания, нарушения или состояния, но не требует этого.

[0088] *Аминокислота.* В самом широком смысле в контексте данного документа термин «аминокислота» относится к любому соединению и/или веществу, которое может

быть включено в полипептидную цепь, например, посредством образования одной или более пептидных связей. В некоторых вариантах осуществления аминокислота имеет общую структуру, например, $H_2N-C(H)(R)-COOH$. В некоторых вариантах осуществления аминокислота представляет собой встречающуюся в природе аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления аминокислота представляет собой не встречающуюся в природе аминокислоту; в некоторых вариантах осуществления аминокислота представляет собой D-аминокислоту; в некоторых вариантах осуществления аминокислота представляет собой L-аминокислоту. «Стандартная аминокислота» относится к любой из двадцати стандартных L-аминокислот, обычно встречающихся в пептидах природного происхождения. «Нестандартная аминокислота» относится к любой аминокислоте, отличной от стандартных аминокислот, независимо от того, получена ли она синтетическим путем или из природного источника. В некоторых вариантах осуществления аминокислота, включая карбокси- и/или аминоконцевую аминокислоту в полипептиде, может содержать структурную модификацию по сравнению с общей структурой, как показано выше. Например, в некоторых вариантах осуществления аминокислота может быть модифицирована метилированием, амидированием, ацетилированием, пегилированием, гликозилированием, фосфорилированием и/или замещением (например, аминогруппы, карбоновой кислоты, одного или более протонов, и/или гидроксильной группы) по сравнению с общей структурой. В некоторых вариантах осуществления такая модификация может, например, изменить время полужизни в кровотоке полипептида, содержащего модифицированную аминокислоту, по сравнению с полипептидом, содержащим в остальном идентичную немодифицированную аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления такая модификация существенно не изменяет соответствующую активность полипептида, содержащего модифицированную аминокислоту, по сравнению с полипептидом, содержащим в остальном идентичную немодифицированную аминокислоту.

[0089] *Антитело.* В контексте данного документа термин «антитело» относится к полипептиду, который включает элементы канонической последовательности иммуноглобулина, достаточные для обеспечения специфического связывания с конкретным антигеном-мишенью. Как известно в данной области техники, интактные антитела, продуцируемые в природе, представляют собой тетрамерные агенты с молекулярной массой приблизительно 150 кДа, состоящие из двух идентичных полипептидов тяжелой цепи (около 50 кДа каждый) и двух идентичных полипептидов легкой цепи (около 25 кДа каждый), которые связываются друг с другом в то, что обычно

называют «Y-образной» структурой. Каждая тяжелая цепь содержит по меньшей мере четыре домена (каждый длиной около 110 аминокислот) – аминоконцевой вариабельный (VH) домен (расположенный на концах Y-структуры), за которым следуют три константных домена: CH1, CH2 и карбоксиконцевой CH3 (расположенный у основания стебля Y). Короткая область, известная как «переключатель», соединяет вариабельную и константную области тяжелой цепи. «Шарнир» соединяет домены CH2 и CH3 с остальной частью антитела. Две дисульфидные связи в этой шарнирной области соединяют два полипептида тяжелой цепи друг с другом в интактном антителе. Каждая легкая цепь состоит из двух доменов: аминоконцевого вариабельного (VL) домена, за которым следует карбоксиконцевой константный (CL) домен, отделенные друг от друга другим «переключателем». Интактные тетрамеры антител состоят из двух димеров тяжелой и легкой цепей, в которых тяжелая и легкая цепи связаны друг с другом одинарной дисульфидной связью; две другие дисульфидные связи соединяют шарнирные области тяжелой цепи друг с другом, так что димеры соединяются друг с другом и образуется тетрамер. Природные антитела также являются гликозилированными, обычно в домене CH2. Каждый домен в природном антителе имеет структуру, характеризующуюся «иммуноглобулиновой складкой», образованной из двух бета-листов (например, 3-, 4- или 5-цепочечных листов), упакованных друг против друга в сжатом антипараллельном бета-цилиндре. Каждый вариабельный домен содержит три гипервариабельные петли, известные как «определяющие комплементарность области» (CDR1, CDR2 и CDR3), и четыре в некоторой степени инвариантных «каркасных» области (FR1, FR2, FR3 и FR4). Когда природные антитела складываются, FR-области образуют бета-листы, которые обеспечивают структурный каркас для доменов, а области петель CDR как тяжелой, так и легкой цепей объединяются в трехмерном пространстве, так что они создают единую гипервариабельный антигенсвязывающий сайт, расположенный на вершине Y-структуры. Область Fc встречающихся в природе антител связывается с элементами системы комплемента, а также с рецепторами на эффекторных клетках, включая, например, эффекторные клетки, которые опосредуют цитотоксичность. Как известно в данной области техники, аффинность и/или другие атрибуты связывания областей Fc с рецепторами Fc можно модулировать посредством гликозилирования или другой модификации. В некоторых вариантах осуществления антитела, полученные и/или применяемые в соответствии с данным изобретением, включают гликозилированные домены Fc, включая домены Fc с модифицированным или сконструированным таким гликозилированием. Для целей данного изобретения, в определенных вариантах

осуществления любой полипептид или комплекс полипептидов, который включает достаточное количество последовательностей домена иммуноглобулина, обнаруженных в природных антителах, может называться и/или применяться как «антитело», независимо от того, произведен ли такой полипептид естественным путем (например, сгенерированный организмом, реагирующим на антиген), или полученный с помощью рекомбинантной инженерии, химического синтеза или другой искусственной системы или методологии. В некоторых вариантах осуществления антитело является моноклональным. В некоторых вариантах осуществления антитело имеет последовательности константной области, характерные для антител мыши, кролика, примата или человека. В некоторых вариантах осуществления элементы последовательности антител являются гуманизированными, приматизированными, химерными и т. д., как известно в данной области техники. Кроме того, термин «антитело», в контексте данного документа, может относиться в соответствующих вариантах осуществления (если не указано иное или не ясно из контекста) к любой из известных в данной области техники или разработанных конструкций или форматов для использования структурных и функциональных особенностей антитела в альтернативном представлении. Например, в некоторых вариантах осуществления антитело, используемое в соответствии с настоящим изобретением, находится в формате, выбранном, помимо прочего, из интактных антител IgA, IgG, IgE или IgM; би- или полиспецифических антител (например, Zybodies® и т. д.); фрагментов антител, таких как фрагменты Fab, фрагменты Fab', фрагменты F(ab')₂, фрагменты Fd', фрагменты Fd и выделенные CDR или их наборы; одноцепочечных Fv; слияний полипептид-Fc; однодоменных антител (например, однодоменные антитела акулы, такие как IgNAR или их фрагменты); антител верблюжьих; маскированных антител (например, Probodyes®); малых модульных иммунофармацевтических препаратов («SMIP™»); одноцепочечных или tandemных диател (TandAb®); VHH; Anticalin®; Nanobody®; минител; BiTE®; белков с анкириновыми повторами или DARPIN®; Avimer®; DART; TCR-подобных антител; Adnectin®; Affilin®; Trans-body®; Affibody®; TrimerX®; микропротеинов; Fynomers®, Centyrin® и KALBITOR®. В некоторых вариантах осуществления антитело может содержать переменный домен тяжелой и/или легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления антитело может не содержать константный домен. В некоторых вариантах осуществления антитело может не иметь ковалентную модификацию (например, присоединение гликана), которую оно имело бы, если бы было получено естественным образом. В некоторых вариантах осуществления антитело может содержать ковалентную модификацию (например, присоединение гликана, полезную

нагрузку [например, обнаруживаемый фрагмент, терапевтический фрагмент, каталитический фрагмент и т. д.] или другую боковую группу [например, полиэтиленгликоль и т. д.).

[0090] *Приблизительно или около.* В контексте данного документа термины «приблизительно» или «около» могут применяться к одному или большему количеству значений, представляющим интерес, включая значение, которое аналогично заявленному эталонному значению. В некоторых вариантах осуществления термин «приблизительно» или «около» относится к диапазону значений, которые попадают в предел $\pm 10\%$ или менее в любую сторону (больше или меньше) от установленного эталонного значения, если не указано иное или иное не очевидно контекста (за исключением случаев, когда такое число превышало бы 100% от возможного значения). Например, в некоторых вариантах осуществления термин «приблизительно» или «около» может охватывать диапазон значений, который находится в пределах 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% или меньше указанного значения.

[0091] *Связанный с.* В контексте данного документа термин «связанный» описывает два события или объекта как «связанные» друг с другом в том смысле, если присутствие, уровень и/или форма одного из них коррелирует с присутствием, уровнем и/или формой другого. Например, конкретный объект (например, полипептид, генетическая сигнатура, метаболит, микроб и т. д.) считается связанным с конкретным заболеванием, нарушением или патологическим состоянием, если его наличие, уровень и/или форма коррелируют с частотой и/или восприимчивостью заболевания, нарушения или патологического состояния (например, среди соответствующей популяции). В некоторых вариантах осуществления два или более объекта физически «связаны» друг с другом, если они взаимодействуют, напрямую или опосредовано, так что они находятся и/или остаются в физической близости друг с другом. В некоторых вариантах осуществления два или более объекта, которые физически связаны друг с другом, ковалентно связаны друг с другом; в некоторых вариантах осуществления два или более объекта, которые физически связаны друг с другом, не связаны друг с другом ковалентной связью, а связаны нековалентно, например, посредством водородных связей, взаимодействия Ван-дер-Ваальса, гидрофобных взаимодействий, магнетизма и их комбинаций.

[0092] *Биологически активный.* В контексте данного документа термин «биологически активный» относится к биологическому эффекту или результату, достигаемому с помощью средства или объекта, представляющего интерес. Например, в

некоторых вариантах осуществления специфическое связывающее взаимодействие является биологической активностью. В некоторых вариантах осуществления модуляция (например, индукция, усиление или ингибирование) биологического пути или события является биологической активностью. В некоторых вариантах осуществления наличие или степень биологической активности оценивают путем обнаружения прямого или опосредованного продукта, образующегося в результате биологического пути или события, представляющего интерес.

[0093] *Характерная часть.* В контексте данного документа термин «характерная часть» в самом широком смысле относится к части вещества, присутствие (или отсутствие) которой коррелирует с присутствием (или отсутствием) определенной характеристики, характерного признака или активности вещества. В некоторых вариантах осуществления характерная часть вещества представляет собой часть, которая обнаруживается в данном веществе и в родственных веществах, которые имеют общую характеристику, характерный признак или активность, но не в веществах, которые не имеют общей характеристики, характерного признака или активности. В некоторых вариантах осуществления характерная часть имеет по меньшей мере одну общую функциональную характеристику с интактным веществом. Например, в некоторых вариантах осуществления «характерная часть» белка или полипептида представляет собой часть, которая содержит непрерывный участок аминокислот или ряд непрерывных участков аминокислот, которые вместе являются характерными для белка или полипептида. В некоторых вариантах осуществления каждый такой непрерывный участок, как правило, содержит по меньшей мере 2, 5, 10, 15, 20, 50 или более аминокислот. В целом, характерная часть вещества (например, белка, антитела и *т.д.*) представляет собой часть, которая, в дополнение к последовательности и/или структурной идентичности, указанной выше, имеет по меньшей мере одну функциональную характеристику с соответствующим интактным веществом. В некоторых вариантах осуществления характерная часть может быть биологически активной.

[0094] *Характерная последовательность.* В контексте данного документа термин «характерная последовательность» представляет собой последовательность, которая обнаруживается у всех членов семейства полипептидов или нуклеиновых кислот, и поэтому может использоваться специалистами в данной области для определения членов семейства.

[0095] *Элемент характерной последовательности.* В контексте данного документа фраза «элемент характерной последовательности» относится к элементу последовательности, обнаруживаемому в полимере (например, в полипептиде или

нуклеиновой кислоте), который представляет собой характерную часть этого полимера. В некоторых вариантах осуществления присутствие характерного элемента последовательности коррелирует с наличием или уровнем определенной активности или свойства полимера. В некоторых вариантах осуществления присутствие (или отсутствие) характерного элемента последовательности определяет конкретный полимер как член (или не член) конкретного семейства или группы таких полимеров. Характерный элемент последовательности обычно включает в себя по меньшей мере два мономера (например, аминокислоты или нуклеотиды). В некоторых вариантах осуществления элемент характерной последовательности включает в себя по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 или более мономеров (например, смежно связанных мономеров). В некоторых вариантах осуществления элемент характерной последовательности включает в себя по меньшей мере первый и второй участки смежных мономеров, разделенных одной или более спейсерными областями, длина которых может варьироваться или не варьироваться между полимерами, имеющими общий элемент последовательности.

[0096] Комбинированная терапия. В контексте данного документа термин «комбинированная терапия» относится к тем ситуациям, в которых субъект одновременно подвергается воздействию двух или более терапевтических схем (например, двух или более лекарственных средств). В некоторых вариантах осуществления два или более средства могут быть введены одновременно. В некоторых вариантах осуществления два или более средства могут быть введены последовательно. В некоторых вариантах осуществления два или более средства могут быть введены согласно перекрывающимся схемам дозирования.

[0097] Сопоставимый. В контексте данного документа термин «сопоставимый» относится к двум или более средствам, объектам, ситуациям, наборам условий, субъектам, популяциям и т.д., которые могут быть не идентичными друг другу, но являются достаточно сходными для проведения сравнения между ними таким образом, чтобы специалисту в данной области техники было понятно, что выводы могут быть обоснованно сделаны на основе наблюдаемых различий или сходств. В некоторых вариантах осуществления сопоставимые наборы средств, объекты, ситуации, наборы условий, субъекты, популяции и т.д. характеризуются множеством по существу идентичных признаков и одним или небольшим количеством разнообразных признаков. Специалистам в данной области техники будет понятно, исходя из контекста, какая степень идентичности требуется в любом данном случае, чтобы два или более таких средств, объектов, ситуаций, наборов условий и т.д. считались сопоставимыми. Например, специалистам в данной

области техники будет понятно, что наборы средств, объекты, ситуации, наборы условий, субъекты, популяции и т.д. являются сопоставимыми друг с другом, если они характеризуются достаточным количеством и типом по существу идентичных признаков, чтобы гарантировать разумный вывод о том, что различия в полученных результатах или явлениях, наблюдаемые при различных наборах обстоятельств, стимулах, средствах, субъектах, ситуациях, наборах условий, субъектах, популяциях и т.д., вызваны или указывают на различия в тех признаках, которые различаются.

[0098] Конструкция. В контексте данного документа термин «конструкция» относится к композиции, включающей полинуклеотид, способный нести по меньшей мере один гетерологичный полинуклеотид. В некоторых вариантах осуществления конструкция может представлять собой плазмиду, транспозон, космиду, искусственную хромосому (например, искусственную хромосому человека (HAC), искусственную хромосому дрожжей (YAC), искусственную хромосому бактерий (BAC) или искусственную хромосому на основе P1 (PAC)) или вирусную конструкцию и любые плазмиды для технологии Gateway®. Конструкция может, например, содержать достаточное количество цис-действующих элементов экспрессии; другие элементы для экспрессии могут быть обеспечены клеткой примата-хозяина или в системе экспрессии *in vitro*. Конструкция может включать любой генетический элемент (например, плазмиду, транспозон, космиду, искусственную хромосому, вирусную конструкцию и т.д.), который способен реплицироваться, когда он связан с соответствующими элементами контроля. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления «конструкция» может включать конструкцию для клонирования и/или экспрессии и/или вирусную конструкцию (например, конструкцию аденоассоциированного вируса (AAV), конструкцию аденовируса, конструкцию лентивируса или конструкцию ретровируса).

[0099] Консервативный. В контексте данного документа термин «консервативный» относится к случаям, описывающим консервативную аминокислотную замену, включая замену аминокислотного остатка другим аминокислотным остатком, имеющим R-группу боковой цепи со сходными химическими свойствами (например, заряд или гидрофобность). В целом, консервативная аминокислотная замена не будет существенно изменять функциональные свойства представляющего интерес белка, например, способность рецептора связываться с лигандом. Примеры групп аминокислот, которые имеют боковые цепи со сходными химическими свойствами, включают: алифатические боковые цепи, такие как глицин (Gly, G), аланин (Ala, A), валин (Val, V), лейцин (Leu, L) и изолейцин (Ile, I); алифатически-гидроксильные боковые цепи, такие как серин (Ser, S) и треонин (Thr, T);

амидсодержащие боковые цепи, такие как аспарагин (Asn, N) и глутамин (Gln, Q); ароматические боковые цепи, такие как фенилаланин (Phe, F), тирозин (Tyr, Y) и триптофан (Trp, W); основные боковые цепи, такие как лизин (Lys, K), аргинин (Arg, R) и гистидин (His, H); кислотные боковые цепи, такие как аспарагиновая кислота (Asp, D) и глутаминовая кислота (Glu, E); и серосодержащие боковые цепи, такие как цистеин (Cys, C) и метионин (Met, M). Группы консервативных аминокислотных замен включают, например, валин/лейцин/изолейцин (Val/Leu/Ile, V/L/I), фенилаланин/тирозин (Phe/Tyr, F/Y), лизин/аргинин (Lys/Arg, K/R), аланин/валин (Ala/Val, A/V), глутамат/аспартат (Glu/Asp, E/D) и аспарагин/глутамин (Asn/Gln, N/Q). В некоторых вариантах осуществления консервативная аминокислотная замена может представлять собой замену любого нативного остатка в белке аланином, как это применяется, например, в аланин-сканирующем мутагенезе. В некоторых вариантах осуществления выполняется консервативная замена, которая имеет положительное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250, раскрытой в Gonnet, GH et al., 1992, Science 256: 1443-1445, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления замена представляет собой умеренно консервативную замену, причем замена имеет неотрицательное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250. Специалистам в данной области техники будет понятно, что изменение (например, замена, добавление, удаление и т.д.) аминокислот, которые не являются консервативными между одним и тем же белком из разных видов, с меньшей вероятностью окажет влияние на функцию белка, и следовательно, эти аминокислоты должны быть отобраны для мутации. Аминокислоты, которые являются консервативными между одними и теми же белками разных видов, не следует изменять (например, удалять, добавлять, заменять и т.д.), поскольку такие мутации с большей вероятностью приведут к изменению функции белка.

КОНСЕРВАТИВНЫЕ АМИНОКИСЛОТНЫЕ ЗАМЕНЫ		
Для аминокислоты	Код	Заменить на
Аланин	A	D-ala, Gly, Aib, β -Ala, Asp, L-Cys, D-Cys
Аргинин	R	D-Arg, Lys, D-Lys, гомо-Arg, D-гомо-Arg, Met, Ile, D-Met, D-Ile, Orn, D-Orn
Аспарагин	N	D-Asn, Asp, D-Asp, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
Аспарагиновая кислота	D	D-Asp, D-Asn, Asn, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln

Цистеин	C	D-Cys, S-Me-Cys, Met, D-Met, Thr, D-Thr
Глутамин	Q	D-Gln, Asn, D-Asn, Glu, D-Glu, Asp, D-Asp
Глутаминовая кислота	E	D-Glu, D-Asp, Asp, Asn, D-Asn, Gln, D-Gln
Глицин	G	Ala, D-Ala, Pro, D-Pro, Aib, β -Ala, Acp
Изолейцин	I	D-Ile, Val, D-Val, AdaA, AdaG, Leu, D-Leu, Met, D-Met
Лейцин	L	D-Leu, Val, D-Val, AdaA, AdaG, Leu, D-Leu, Met, D-Met
Лизин	K	D-Lys, Arg, D-Arg, гомо-Arg, D-гомо-Arg, Met, D-Met, Ile, D-Ile, Orn, D-Orn
Метионин	M	D-Met, S-Me-Cys, Ile, D-Ile, Leu, D-Leu, Val, D-Val
Фенилаланин	F	D-Phe, Tyr, D-Thr, L-Dopa, His, D-His, Trp, D-Trp, Транс-3,4 или 5-фенилпролин, AdaA, AdaG, цис-3,4 или 5-фенилпролин, Бра, D-Бра
Пролин	P	D-Pro, L-I-тиоазолидин-4-карбоновая кислота, D-или-L-1-оксазолидин-4-карбоновая кислота (Кауег, патент США № 4 511 390, полностью включенный в данный документ посредством ссылки)
Серин	S	D-Ser, Thr, D-Thr, алло-Thr, Met, D-Met, Met (O), D-Met (O), L-Cys, D-Cys
Треонин	T	D-Thr, Ser, D-Ser, алло-Thr, Met, D-Met, Met (O), D-Met (O), Val, D-Val
Тирозин	Y	D-Tyr, Phe, D-Phe, L-Доба, His, D-His
Валин	V	D-Val, Leu, D-Leu, Ile, D-Ile, Met, D-Met, AdaA, AdaG

[0100] Контроль. В контексте данного документа термин «контроль» относится к понимаемому в данной области техники значению «контроль», являющемуся стандартом, с которым сравниваются результаты. Как правило, контроли используются для повышения целостности в экспериментах путем выделения переменных с целью выведения заключений о данных переменных. В некоторых вариантах осуществления контроль представляет собой реакцию или анализ, который проводится одновременно с тестовой реакцией или анализом для получения компаратор. Например, в одном эксперименте применяется «тест» (т. е. проверяемая переменная). Во втором эксперименте, «контрольном», проверяемая

переменная не применяется. В некоторых вариантах осуществления контроль представляет собой исторический контроль (например, тест или анализ, выполненные ранее, или количества или результат, которые ранее известны). В некоторых вариантах осуществления контроль представляет собой или включает напечатанную или иным образом сохраненную запись. В некоторых вариантах осуществления контроль является положительным контролем. В некоторых вариантах осуществления контроль является отрицательным контролем.

[0101] *Определение, измерение, оценивание, количественное определение и анализирование.* В контексте данного документа термины «определение», «измерение», «оценивание», «количественное определение» и «анализирование» могут применяться взаимозаменяем и относятся к любой форме измерения, и включают определение, присутствует ли элемент или нет. Такие термины включают оба из количественного и/или качественного определений. Оценка может быть относительной или абсолютной. Например, термин «анализ на наличие» может обозначать определение количества присутствующего вещества и/или определение того, присутствует оно или отсутствует.

[0102] *Сконструированный.* В целом, в контексте данного документа термин «сконструированный» относится к аспекту, связанному с манипуляциями со стороны человека. Например, клетка или организм считаются «сконструированными», если с ними проводили манипуляции таким образом, что была изменена их генетическая информация (например, был введен новый генетический материал, который ранее отсутствовал, например, путем трансформации, спаривания, соматической гибридизации, трансфекции, трансдукция или другого механизма, или ранее присутствующий генетический материал был изменен или удален, например, путем замены или делеционной мутации или с помощью протоколов спаривания). Как обычно применяется на практике и понятно специалистам в данной области, потомство сконструированного полинуклеотида или клетки обычно все еще называют «сконструированным», даже если фактическое вмешательство выполняли на предшествующем объекте. В некоторых вариантах осуществления «конструирование» включает в себя «гуманизацию» кодирующей последовательности. В некоторых вариантах осуществления «гуманизация» может включать введение не кодирующих последовательностей человека, таких как интроны и регуляторные элементы, в последовательность, не являющуюся человеческой. В некоторых вариантах осуществления «гуманизация» может включать кодон, оптимизирующий нуклеотидную последовательность для применения у человека. В некоторых вариантах осуществления «гуманизация» может включать в себя замену части полипептида (такой как

домен, например, каркасная область или область комплементарного домена) или нуклеотидной последовательности (например, кодирующей или некодирующей) человеческим полипептидом или нуклеотидной последовательностью.

[0103] *Вспомогательное вещество.* В контексте данного документа термин «вспомогательное вещество» относится к неактивному (например, нетерапевтическому) агенту, который может быть включен в фармацевтическую композицию, например, для обеспечения или достижения необходимой консистенции или стабилизирующего эффекта. В некоторых вариантах осуществления подходящие фармацевтические вспомогательные вещества могут включать, например, крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, мел, силикагель, стеарат натрия, моностеарат глицерина, тальк, хлорид натрия, сухое обезжиренное молоко, глицерин, пропиленгликоль, воду, этанол и т. п.

[0104] *Экспрессия.* В контексте данного документа термин «экспрессия» последовательности нуклеиновой кислоты относится к образованию любого генного продукта (например, транскрипта, например, мРНК, например, полипептида и т.д.) из последовательности нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления генный продукт может представлять собой транскрипт. В некоторых вариантах осуществления генный продукт может представлять собой полипептид. В некоторых вариантах осуществления экспрессия последовательности нуклеиновой кислоты включает одно или более из следующего: (1) продукции матрицы РНК из последовательности ДНК (например, путем транскрипции); (2) процессинга транскрипта РНК (например, путем сплайсинга, редактирования, образования 5'-кэп-структуры и/или образования 3'-концевой структуры); (3) трансляции РНК в полипептид или белок; и/или (4) посттрансляционной модификации полипептида или белка.

[0105] *Функциональный.* В контексте данного документа термин «функциональный» описывает что-то, что существует в форме, в которой оно проявляет свойство и/или активность, которыми оно характеризуется. Например, в некоторых вариантах осуществления «функциональная» биологическая молекула представляет собой биологическую молекулу в форме, в которой она проявляет свойство и/или активность, которыми она характеризуется. В некоторых таких вариантах осуществления функциональная биологическая молекула характеризуется по сравнению с другой биологической молекулой, которая является нефункциональной, в том смысле, что «нефункциональная» версия не проявляет того же или эквивалентного свойства и/или активности, что и «функциональная» молекула. Биологическая молекула может иметь одну функцию, две функции (т. е. бифункциональная) или много функций (т. е.

многофункциональная).

[0106] *Ген.* В контексте данного документа термин «ген» относится к последовательности ДНК, которая кодирует генный продукт (например, продукт РНК, например, продукт полипептида). В некоторых вариантах осуществления ген включает кодирующую последовательность (то есть последовательность, которая кодирует конкретный продукт). В некоторых вариантах ген включает некодирующую последовательность. В некоторых конкретных вариантах осуществления ген может включать как кодирующую (например, экзонную), так и некодирующую (например, интронную) последовательность. В некоторых вариантах ген может включать одну или несколько регуляторных последовательностей (например, промоторов, энхансеров и т. д.) и/или интронных последовательностей, которые, например, могут контролировать или влиять на один или несколько аспектов экспрессии генов (например, экспрессия, специфичная для клеточного типа, индуцибельная экспрессия и т. д.). В контексте данного документа термин «ген» обычно относится к части нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид или его фрагмент; термин может необязательно включать регуляторные последовательности, что будет понятно из контекста специалистам в данной области техники. Это определение не предназначено для исключения применения термина «ген» к не кодирующим белок единицам экспрессии, а скорее для пояснения того, что в большинстве случаев термин, используемый в данном этом документе, относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей полипептид. В некоторых вариантах осуществления ген может кодировать полипептид, но этот полипептид может быть нефункциональным, например, вариант гена может кодировать полипептид, который не функционирует таким же образом или вообще не функционирует по сравнению с геном дикого типа. В некоторых вариантах осуществления ген может кодировать транскрипт, который в некоторых вариантах осуществления может проявлять токсичность выше порогового уровня. В некоторых вариантах осуществления ген может кодировать полипептид, но этот полипептид может быть нефункциональным и/или может проявлять токсичность выше порогового уровня.

[0107] *Потеря слуха.* В контексте данного документа термин «потеря слуха» может использоваться для обозначения частичной или полной неспособности живого организма слышать. В некоторых вариантах осуществления потеря слуха может быть приобретенной. В некоторых вариантах осуществления потеря слуха может быть наследственной. В некоторых вариантах осуществления потеря слуха может быть генетической. В некоторых вариантах осуществления потеря слуха может возникнуть в результате заболевания или

травмы (например, физической травмы, лечения одним или более агентами, приводящими к потере слуха, и т. д.). В некоторых вариантах осуществления потеря слуха может быть обусловлена одной или более известными генетическими причинами и/или синдромами. В некоторых вариантах осуществления потеря слуха может иметь неизвестную этиологию. В некоторых вариантах осуществления степень потери слуха может быть снижена или не снижена с помощью слуховых аппаратов или других видов лечения.

[0108] *Гетерологичный*. В контексте данного документа термин «гетерологичный» может использоваться в отношении одной или более областей конкретной молекулы по сравнению с другой областью и/или другой молекулой. Например, в некоторых вариантах осуществления гетерологичные полипептидные домены относятся к тому факту, что полипептидные домены в природе не встречаются вместе (например, в одном и том же полипептиде). Например, в слитых белках, созданных человеком, полипептидный домен из одного полипептида может быть слит с полипептидным доменом из другого полипептида. В таком слитом белке два полипептидных домена будут считаться «гетерологичными» по отношению друг к другу, поскольку в природе они не встречаются вместе.

[0109] *Идентичность*. В контексте данного документа термин «идентичность» относится к общему сходству между полимерными молекулами, например, между молекулами нуклеиновых кислот (например, молекулами ДНК и/или молекулами РНК) и/или между молекулами полипептидов. В некоторых вариантах осуществления полимерные молекулы считаются «по существу идентичными» друг другу, если их последовательности являются по меньшей мере на 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичными. Например, вычисление процентной идентичности двух полинуклеотидных последовательностей может быть выполнено путем выравнивания двух последовательностей с целью оптимального сравнения (например, гэпы могут быть введены в одну или обе из первой и второй последовательностей нуклеиновых кислот для оптимального выравнивания и неидентичные последовательности могут игнорироваться с целью сравнения). В некоторых вариантах осуществления длина последовательности, выровненной для целей сравнения, составляет по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по существу 100% длины эталонной последовательности; затем сравнивают нуклеотиды в соответствующих положениях. Если положение в первой последовательности занято тем же остатком (например, нуклеотидом или аминокислотой),

что и соответствующее положение во второй последовательности, то две молекулы (т. е. первая и вторая) являются идентичными в этом положении. Процент идентичности между двумя последовательностями является функцией от числа совпадающих положений в двух сравниваемых последовательностях с учетом числа гэпов и длины каждого гэпа, которые необходимо вносить для оптимального выравнивания двух последовательностей. Сравнение последовательностей и определение процента идентичности между двумя последовательностями можно осуществлять с помощью математического алгоритма. Например, процент идентичности между двумя нуклеотидными последовательностями можно определить с использованием алгоритма Мейерса и Миллера (CABIOS, 1989, 4: 11-17, который полностью включен в данный документ посредством ссылки), который был включен в программу ALIGN (версия 2.0). В некоторых вариантах осуществления при сравнениях последовательностей нуклеиновых кислот, выполненных с помощью программы ALIGN, используют таблицу весовых остатков PAM120, штраф за длину гэпа 12 и штраф за гэп 4.

[0110] *Улучшать, увеличивать, ингибировать или уменьшать.* В контексте данного документа термины «улучшать», «увеличивать», «ингибировать» или «уменьшать» или их грамматические эквиваленты указывают на значения, которые относятся к измерению на исходном уровне или другому эталонному измерению. В некоторых вариантах осуществления значение статистически значимо отличается от измерения на исходном уровне или другого эталонного измерения. В некоторых вариантах осуществления соответствующее эталонное измерение может представлять собой или включать в себя измерение в конкретной системе (например, у одного человека) в других сопоставимых условиях при отсутствии (например, до и/или после) конкретного агента или лечения, или в присутствии соответствующего сопоставимого эталонного агента. В некоторых вариантах осуществления подходящее эталонное измерение может представлять собой или включать в себя измерение в сопоставимой системе, о которой известно или ожидается, что она будет реагировать определенным образом в присутствии соответствующего агента или лечения. В некоторых вариантах осуществления подходящий эталон является отрицательным эталоном; в некоторых вариантах осуществления подходящий эталон является положительным эталоном.

[0111] *Нуклеиновая кислота.* В контексте данного документа термин «нуклеиновая кислота» в самом широком смысле относится к любому соединению и/или веществу, которое включено или может быть включено в олигонуклеотидную цепь. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота представляет собой соединение и/или

вещество, которое входит или может быть включено в олигонуклеотидную цепь посредством фосфодиэфирной связи. Как будет понятно из контекста, в некоторых вариантах осуществления «нуклеиновая кислота» относится к отдельному остатку нуклеиновой кислоты (например, нуклеотиду и/или нуклеозиду); в некоторых вариантах осуществления «нуклеиновая кислота» относится к олигонуклеотидной цепи, содержащей отдельные остатки нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления «нуклеиновая кислота» представляет собой или включает РНК; в некоторых вариантах осуществления «нуклеиновая кислота» представляет собой или включает ДНК. В некоторых вариантах осуществления «нуклеиновая кислота» представляет собой, содержит или состоит из одного или более остатков естественной нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления «нуклеиновая кислота» представляет собой, содержит или состоит из одного или более аналогов нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах осуществления аналог нуклеиновой кислоты отличается от «нуклеиновой кислоты» тем, что он не использует фосфодиэфирный каркас. Альтернативно или дополнительно, в некоторых вариантах осуществления «нуклеиновая кислота» имеет одну или несколько фосфоротиоатных и/или 5'-N-фосфорамидитных связей, а не фосфодиэфирных связей. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота представляет собой, включает или состоит из одного или более природных нуклеозидов (например, аденозина, тимидина, гуанозина, цитидина, уридина, дезоксиаденозина, дезокситимидина, дезоксигуанозина и дезоксицитидина). В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота представляет собой, включает или состоит из одного или более нуклеозидных аналогов (например, 2-аминоаденозина, 2-тиотимидина, инозина, пирролопиримидина, 3-метиладенозина, 5-метилцитидина, C-5 пропинилцитидина, C-5 пропинил-уридина, 2-аминоаденозина, C5-бромуридина, C5-фторуридина, C5-йодуридина, C5-пропинил-уридина, C5-пропинил-цитидина, C5-метилцитидина, 2-аминоаденозина, 7-аминоадаина, 7-дезагуанозина, 8-оксоаденозина, 8-оксогуанозина, O(6)-метилгуанина, 2-тиоцитидина, метилированных оснований, интеркалированных оснований и их комбинации). В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота включает один или более модифицированных сахаров (например, 2'-фторрибозу, рибозу, 2'-дезоксирибозу, арабинозу и гексозу) по сравнению с таковыми в естественных нуклеиновых кислотах. В некоторых вариантах осуществления «нуклеиновая кислота» имеет нуклеотидную последовательность, которая кодирует функциональный генный продукт, такой как РНК или белок. В некоторых вариантах осуществления «нуклеиновая кислота» включает один или более интронов. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты

получают путем одного или более из выделения из природного источника, ферментативного синтеза путем полимеризации на основе комплементарной матрицы (*in vivo* или *in vitro*), размножения в рекомбинантной клетке или системе и химического синтеза. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота имеет длину по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000 или более остатков. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота является частично или полностью одноцепочечной; в некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота является частично или полностью двухцепочечной. В некоторых вариантах осуществления «нуклеиновая кислота» имеет нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере один элемент, который кодирует полипептид, или являющуюся комплементарной последовательности, которая кодирует полипептид. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота обладает ферментативной активностью.

[0112] Функционально связанный. В контексте данного документа термин «функционально связанный» относится к взаимному расположению, в котором описываемые таким образом компоненты находятся во взаимосвязи, обеспечивающей их функционирование предпологаемым для них образом. Элемент контроля, «функционально связанный» с функциональным элементом, связан таким образом, что выражение и/или активность функционального элемента достигается в условиях, совместимых с элементом контроля. В некоторых вариантах осуществления «функционально связанные» элементы контроля расположены смежно (например, ковалентно связаны) с представляющими интерес элементами кодирования; в некоторых вариантах осуществления элементы контроля действуют в направлении, противоположном представляющему интерес функциональному элементу, или наоборот. В некоторых вариантах осуществления «функционально соединенный» относится к функциональной связи между регуляторной последовательностью и гетерологичной нуклеотидной последовательностью, которая приводит к экспрессии последней. Например, первая последовательность нуклеиновой кислоты является функционально соединенной со второй последовательностью нуклеиновой кислоты, когда первая последовательность нуклеиновой кислоты попадает в функциональную взаимосвязь со второй последовательностью нуклеиновой кислоты. Например, в некоторых вариантах осуществления функциональная связь может включать транскрипционный контроль. Например, промотор является функционально связанным с

кодирующей последовательностью, если промотор влияет на транскрипцию или экспрессию кодирующей последовательности. Функционально соединенные последовательности ДНК могут быть смежными друг с другом и, например, если необходимо соединить две кодирующие белок области, находиться в одной и той же рамке считывания.

[0113] *Фармацевтическая композиция.* В контексте данного документа термин «фармацевтическая композиция» относится к композиции, в которой активный агент составлен вместе с одним или более фармацевтически приемлемыми носителями. В некоторых вариантах осуществления активный агент присутствует в количестве стандартной дозы, подходящем для введения в терапевтической схеме, которая демонстрирует статистически значимую вероятность достижения заданного терапевтического эффекта при введении соответствующей совокупности организмов. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция может быть специально составлена для введения в твердой или жидкой форме, включая те, которые адаптированы, например, для введения, например, инъекционная композиция, которая представляет собой, например, водный или неводный раствор, или суспензию, или жидкую каплю, предназначенную для введения в ушной канал. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция может быть составлена для введения путем инъекции либо в определенный орган или участок, например, непосредственно в ухо, либо системно, например, внутривенно. В некоторых вариантах осуществления композиция может представлять собой или включать жидкую лекарственную форму для перорального введения (водные или неводные растворы или суспензии), таблетки, болюсы, порошки, гранулы, пасты, капсулы, порошки и т.д. В некоторых вариантах осуществления активный агент может представлять собой или включать выделенное, очищенное или чистое соединение.

[0114] *Фармацевтически приемлемый.* В контексте данного документа термин «фармацевтически приемлемый», который, например, может быть использован в отношении носителя, разбавителя или вспомогательного вещества, используемого для составления фармацевтической композиции, как раскрыто в данном документе, означает, что носитель, разбавитель или вспомогательное вещество совместимы с другими ингредиентами композиции и не оказывают вредного воздействия на получателя композиции.

[0115] *Фармацевтически приемлемый носитель.* В контексте данного документа термин «фармацевтически приемлемый носитель» означает фармацевтически приемлемый

материал, композицию или несущую среду, например, жидкий или твердый наполнитель, разбавитель, вспомогательное вещество или растворитель, инкапсулирующий материал, участвующий в переносе или транспортировке рассматриваемого соединения от одного органа или части тела к другому органу или части тела. Каждый носитель должен быть «приемлемым» в смысле совместимости с другими ингредиентами препарата и не причинять вреда пациенту. Некоторые примеры материалов, которые могут служить фармацевтически приемлемыми носителями, включают: сахара, такие как лактоза, глюкоза и сахароза; крахмалы, такие как кукурузный крахмал и картофельный крахмал; целлюлозу и ее производные, такие как карбоксиметилцеллюлоза натрия, этилцеллюлоза и ацетат целлюлозы; порошкообразный трагакант; солод; желатин; тальк; вспомогательные вещества, такие как масло какао и воски для суппозиторий; масла, такие как арахисовое масло, хлопковое масло, сафлоровое масло, кунжутное масло, оливковое масло, кукурузное масло и соевое масло; гликоли, такие как пропиленгликоль; полиолы, такие как глицерин, сорбит, маннит и полиэтиленгликоль; сложные эфиры, такие как этилолеат и этиллаурат; агар; буферные агенты, такие как гидроксид магния и гидроксид алюминия; альгиновую кислоту; апирогенную воду; изотонический физиологический раствор; раствор Рингера; этиловый спирт; рН-забуференные растворы; сложные полиэфиры, поликарбонаты и/или полиангидриды; и другие нетоксичные совместимые вещества, применяемые в фармацевтических составах.

[0116] Полиаденилирование. В контексте данного документа термин «полиаденилирование» относится к ковалентной связи полиаденилового фрагмента или его модифицированного варианта с молекулой матричной РНК. У эукариот большинство молекул матричной РНК (мРНК) являются полиаденилированными на 3'-конце. В некоторых вариантах осуществления 3'-поли(А)-хвост представляет собой длинную последовательность адениновых нуклеотидов (например, 50, 60, 70, 100, 200, 500, 1000, 2000, 3000, 4000 или 5000)(SEQ ID NO: 117), добавленных к пре-мРНК посредством действия фермента полиаденилат-полимеразы. У высших эукариот поли(А)-хвост может быть добавлен к транскриптам, которые содержат конкретную последовательность, сигнал полиаденилирования или «последовательность поли(А)». Поли(А)-хвост и связанные с ним белки способствуют защите мРНК от деградации экзонуклеазами. Полиаденилирование может влиять на терминацию транскрипции, экспорт мРНК из ядра и трансляцию. Как правило, полиаденилирование происходит в ядре непосредственно после транскрипции ДНК в РНК, однако может дополнительно происходить позже в цитоплазме. После окончания транскрипции цепь мРНК может расщепляться действием комплекса

эндонуклеазы, ассоциированного с РНК-полимеразой. Участок расщепления может характеризоваться присутствием последовательности оснований AAUAAA возле участка расщепления. После расщепления мРНК аденозиновые остатки могут быть добавлены к свободному 3'-концу на участке расщепления. В контексте данного документа термин «последовательность поли(А)» представляет собой последовательность, которая запускает эндонуклеазное расщепление мРНК и добавление ряда аденозинов к 3'-концу расщепленной мРНК.

[0117] *Полипептид*. В контексте данного документа термин "полипептид" относится к любой полимерной цепи остатков (например, аминокислот), которые обычно связаны пептидными связями. В некоторых вариантах осуществления полипептид имеет аминокислотную последовательность, которая встречается в природе. В некоторых вариантах осуществления полипептид имеет аминокислотную последовательность, которая не встречается в природе. В некоторых вариантах осуществления полипептид имеет аминокислотную последовательность, которая сконструирована таким образом, что она сконструирована и/или продуцирована посредством действий человека. В некоторых вариантах осуществления полипептид может включать или состоять из природных аминокислот, неприродных аминокислот или и тех, и других. В некоторых вариантах осуществления полипептид может включать одну или более боковых групп или другие модификации, например, модификацию или присоединение к одной или более боковым цепям аминокислот, на N-конце полипептида, на C-конце полипептида или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления такие боковые группы или модификации могут представлять собой ацетилирование, амидирование, липидирование, метилирование, пегилирование и т.д., включая их комбинации. В некоторых вариантах осуществления полипептиды могут содержать L-аминокислоты, D-аминокислоты или и то, и другое, и могут содержать любую из множества модификаций или аналогов аминокислот, известных в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления применимые модификации могут представлять собой или включать, например, терминальное ацетилирование, амидирование, метилирование и т.д. В некоторых вариантах осуществления белок может содержать природные аминокислоты, неприродные аминокислоты, синтетические аминокислоты и их комбинации. Термин «пептид» обычно используется для обозначения полипептида, имеющего длину менее около 100 аминокислот, менее около 50 аминокислот, менее 20 аминокислот или менее 10 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления белок представляет собой антитела, фрагменты антител, их биологически активные части и/или их характерные части.

[0118] Полинуклеотид. В контексте данного документа термин «полинуклеотид» относится к любой полимерной цепи нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид представляет собой или включает РНК; в некоторых вариантах осуществления полинуклеотид представляет собой или включает ДНК. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид представляет собой, содержит или состоит из одного или более остатков естественной нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид представляет собой, содержит или состоит из одного или более аналогов нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах осуществления аналог полинуклеотида отличается от «нуклеиновой кислоты» тем, что он не использует фосфодиэфирный каркас. Альтернативно или дополнительно, в некоторых вариантах осуществления полинуклеотид имеет одну или более фосфоротиоатных и/или 5'-N-фосфорамидитных связей, а не фосфодиэфирных связей. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид представляет собой, включает или состоит из одного или более природных нуклеозидов (например, аденозина, тимидина, гуанозина, цитидина, уридина, дезоксиаденозина, дезокситимидина, дезоксигуанозина и дезоксицитидина). В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид представляет собой, включает или состоит из одного или более нуклеозидных аналогов (например, 2-аминоаденозина, 2-тиотимидина, инозина, пирролопиримидина, 3-метиладенозина, 5-метилцитидина, C-5 пропинилцитидина, C-5 пропинил-уридина, 2-аминоаденозина, C5-бромуридина, C5-фторуридина, C5-йодуридина, C5-пропинил-уридина, C5-пропинил-цитидина, C5-метилцитидина, 2-аминоаденозина, 7-аминоазадина, 7-деазагуанозина, 8-оксоаденозина, 8-оксогуанозина, O(6)-метилгуанина, 2-тиоцитидина, метилированных оснований, интеркалированных оснований и их комбинации). В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид включает один или более модифицированных сахаров (например, 2'-фторибозу, рибозу, 2'-дезоксирибозу, арабинозу и гексозу) по сравнению с таковыми в естественных нуклеиновых кислотах. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид имеет нуклеотидную последовательность, которая кодирует функциональный генный продукт, такой как РНК или белок. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид включает один или более интронов. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид получают путем одного или более из выделения из природного источника, ферментативного синтеза путем полимеризации на основе комплементарной матрицы (*in vivo* или *in vitro*), размножения в рекомбинантной клетке или системе и химического синтеза. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид имеет длину по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70,

75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000 или более остатков. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид является частично или полностью одноцепочечным; в некоторых вариантах осуществления полинуклеотид является частично или полностью двухцепочечным. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид имеет нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере один элемент, который кодирует полипептид, или являющуюся комплементарной последовательности, которая кодирует полипептид. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид обладает ферментативной активностью.

[0119] Белок. В контексте данного документа термин «белок» относится к полипептиду (т. е. цепочке из по меньшей мере двух аминокислот, связанных друг с другом пептидными связями). Белки могут включать фрагменты, отличные от аминокислот (например, могут представлять собой гликопротеины, протеогликаны и т. д.), и/или могут быть обработаны или модифицированы иным образом. Специалистам в данной области техники будет понятно, что «белок» может представлять собой полную полипептидную цепь, продуцируемую клеткой (с сигнальной последовательностью или без нее), или может представлять собой ее характерную часть. Специалистам в данной области техники будет понятно, что белок иногда может включать более одной полипептидной цепи, например, связанной одной или более дисульфидными связями или связанной другими способами.

[0120] Рекомбинантный. В контексте данного документа термин «рекомбинантный» предназначен для обозначения полипептидов, которые разработаны, сконструированы, получены, экспрессированы, созданы, произведены и/или выделены с помощью рекомбинантных средств, таких как полипептиды, экспрессируемые с использованием рекомбинантной конструкции для экспрессии, трансфицированной в клетку-хозяин; полипептидов, выделенных из рекомбинантной комбинаторной библиотеки полипептидов человека; полипептидов, выделенных из животного (например, мыши, кролика, овцы, рыбы и т. д.), которое является трансгенным или подвергалось иным манипуляциям для экспрессии гена или генов, или компонентов генов, которые кодируют и/или направляют экспрессию полипептида или одного или более их компонентов, частей, элементов или доменов; и/или полипептидов, полученных, экспрессированных, созданных или выделенных любыми другими способами, которые включают сплайсинг или лигирование выбранных элементов последовательности нуклеиновых кислот друг с другом, химический синтез выбранных элементов последовательности и/или получение иным образом

нуклеиновой кислоты, которая кодирует и/или направляет экспрессию полипептида или одного или более из его компонента(-ов), части(-ей), элемента(-ов) или домена(-ов). В некоторых вариантах осуществления один или более таких выбранных элементов последовательности встречаются в природе. В некоторых вариантах осуществления один или несколько таких выбранных элементов последовательности сконструированы *in silico*. В некоторых вариантах осуществления один или более таких выбранных элементов последовательности являются результатом мутагенеза (например, *in vivo* или *in vitro*) известного элемента последовательности, например, из природного или синтетического источника, такого как, например, из зародышевой линии представляющего интерес исходного организма (например, человека, мыши и т. д.).

[0121] *Эталон.* В контексте данного документа термин «эталон» описывает стандарт или контроль, относительно которого проводится сравнение. Например, в некоторых вариантах осуществления представляющие интерес агент, животное, индивида, популяцию, образец, последовательность или значение сравнивают с эталонными или контрольными агентом, животным, индивидом, популяцией, образцом, последовательностью или значением. В некоторых вариантах осуществления исследование и/или определение для эталона или контроля проводят практически одновременно с представляющим интерес исследованием или определением. В некоторых вариантах осуществления эталон или контроль представляет собой ретроспективный эталон или контроль, необязательно, отображенный на материальном носителе. Как правило, как очевидно для специалистов в данной области, определение или получение характеристик эталона или контроля проводят в условиях или при обстоятельствах, сравнимых с теми, для которых проводится оценка. Для специалистов в данной области техники очевиден факт присутствия достаточного сходства для подтверждения достоверности и/или сравнения с конкретным возможным эталоном или контролем. В некоторых вариантах осуществления эталон представляет собой эталон отрицательного контроля; в некоторых вариантах осуществления эталон представляет собой эталон положительного контроля.

[0122] *Регуляторный элемент.* В контексте данного документа термин «регуляторный элемент» или «регуляторная последовательность» относится к некодирующим областям ДНК, которые каким-то образом регулируют экспрессию одного или более конкретных генов. В некоторых вариантах осуществления такие гены расположены напротив или «по соседству» с данным регуляторным элементом. В некоторых вариантах осуществления такие гены расположены достаточно далеко от указанного регуляторного элемента. В некоторых вариантах осуществления регуляторный элемент нарушает или усиливает

транскрипцию одного или более генов. В некоторых вариантах осуществления регуляторный элемент может быть расположен в цис-положении относительно регулируемого гена. В некоторых вариантах осуществления регуляторный элемент может быть расположен в транс-положении относительно регулируемого гена. Например, в некоторых вариантах осуществления регуляторная последовательность относится к последовательности нуклеиновой кислоты, которая регулирует экспрессию генного продукта, функционально связанного с регуляторной последовательностью. В некоторых таких вариантах осуществления эта последовательность может представлять собой энхансерную последовательность и другие регуляторные элементы, которые регулируют экспрессию генного продукта.

[0123] *Образец.* В контексте данного документа термин «образец» обычно относится к аликвоте материала, полученного или полученного из представляющего интерес источника. В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес источник представляет собой биологический источник или природный источник. В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес источник может представлять собой или включать клетку или организм, такой как микроб (например, вирус), растение или животное (например, человека). В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес источник представляет собой или включает биологическую ткань или жидкость. В некоторых вариантах осуществления биологическая ткань или жидкость может представлять собой или включать амниотическую жидкость, водянистую влагу, асцит, желчь, костный мозг, кровь, грудное молоко, спинномозговую жидкость, ушную серу, хилус, химус, эякулят, эндолимфу, экссудат, фекалии, желудочную кислоту, желудочный сок, лимфу, слизь, перикардальную жидкость, перилимфу, перитонеальную жидкость, плевральную жидкость, гной, выделения слизистых оболочек, слюну, кожное сало, сперму, сыворотку, смегму, мокроту, синовиальную жидкость, пот, слезы, мочу, вагинальные выделения, жидкость стекловидного тела, рвотные массы и/или их комбинации или компоненты. В некоторых вариантах осуществления биологическая жидкость может представлять собой или включать внутриклеточную жидкость, внеклеточную жидкость, внутрисосудистую жидкость (плазму крови), интерстициальную жидкость, лимфатическую жидкость и/или трансцеллюлярную жидкость. В некоторых вариантах осуществления биологическая жидкость может представлять собой растительный экссудат или содержать его. В некоторых вариантах осуществления биологическая ткань или образец могут быть получены, например, путем аспирации, биопсии (например, тонкоигольной биопсии или биопсии ткани), мазка (например, орального, носового, кожного или вагинального мазка),

соскоба, хирургического вмешательства, промывания или лаважа (например, бронхоальвеолярного, протокового, назального, глазного, орального, маточного, вагинального или другого промывания или лаважа). В некоторых вариантах осуществления биологический образец представляет собой или включает клетки, полученные от индивидуума. В некоторых вариантах осуществления образец представляет собой «первичный образец», полученный непосредственно из представляющего интерес источника любым подходящим способом. В некоторых вариантах осуществления, как следует из контекста, термин «образец» относится к препарату, полученному путем обработки (например, путем удаления одного или более компонентов и/или добавления одного или более агентов) исходного образца. Например, фильтрация с применением полупроницаемой мембраны. Такой «обработанный образец» может содержать, например, нуклеиновые кислоты или белки, выделенные из образца или полученные путем применения к первичному образцу одного или более методов, таких как амплификация или обратная транскрипция нуклеиновой кислоты, выделение и/или очистка некоторых компонентов и т. д.

[0124] *Субъект.* В контексте данного документа термин «субъект» относится к организму, как правило, млекопитающему (например, человеку, в некоторых вариантах осуществления, включая пренатальные человеческие формы). В некоторых вариантах осуществления субъект страдает соответствующим заболеванием, нарушением или состоянием. В некоторых вариантах осуществления субъект восприимчив к заболеванию, нарушению или состоянию. В некоторых вариантах осуществления у субъекта проявляется один или более симптомов или характеристик заболевания, нарушения или состояния. В некоторых вариантах осуществления у субъекта не проявляется никаких симптомов или характеристик заболевания, нарушения или состояния. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой лицо с одной или более характеристиками, характеризующими предрасположенность или риск развития заболевания, нарушения или состояния. В некоторых вариантах осуществления субъектом является пациент. В некоторых вариантах осуществления субъектом является индивидуум, которому поставлен диагноз и/или назначена терапия.

[0125] *По существу.* В контексте данного документа термин «по существу» относится к качественному состоянию, демонстрирующему общую или почти полную степень, или степень представляющей интерес характеристики или свойства. Квалифицированный специалист в данной области техники поймет, что биологические и химические явления редко, если вообще когда-либо, доходят до завершения и/или переходят к завершению,

достигают или исключают абсолютный результат. Таким образом, термин «по существу» используется в данном документе для обозначения потенциального недостатка полноты, присущей многим биологическим и химическим явлениям.

[0126] *Лечение.* В контексте данного документа термин «лечение» (также «лечить» или «процесс лечения») относится к любому введению терапии, которая частично или полностью облегчает, ослабляет, улучшает, подавляет, задерживает начало, снижает тяжесть и/или уменьшает частоту появления одного или более симптомов, признаков и/или причин конкретного заболевания, нарушения и/или состояния. В некоторых вариантах осуществления такое лечение может проводиться у субъекта, у которого не проявляются признаки соответствующего заболевания, нарушения и/или состояния, и/или субъекта, у которого проявляются только ранние признаки заболевания, нарушения и/или состояния. Альтернативно или дополнительно, такое лечение может проводиться у субъекта, у которого проявляется один или более установленных признаков соответствующего заболевания, нарушения и/или состояния. В некоторых вариантах осуществления лечение может проводиться у субъекта, которому был поставлен диагноз соответствующего заболевания, нарушения и/или состояния. В некоторых вариантах осуществления лечение может проводиться у субъекта, о котором известно, что у него имеется один или более факторов восприимчивости, которые статистически коррелируют с повышенным риском развития указанного заболевания, нарушения и/или состояния.

[0127] *Опухоль.* В контексте данного документа термин «опухоль» относится к аномальному росту клеток или ткани. В некоторых вариантах осуществления опухоль может содержать клетки, которые являются предраковыми (*например, доброкачественными*), злокачественными, преметастатическими, метастатическими и/или неметастатическими. В некоторых вариантах осуществления опухоль ассоциирована с раком или является его проявлением. В некоторых вариантах осуществления опухоль может представлять собой дисперсную опухоль или жидкостную опухоль. В некоторых вариантах осуществления опухоль может представлять собой солидную опухоль.

[0128] *Вариант.* В контексте данного документа термин «вариант» относится к версии чего-либо, например, последовательности гена, которая каким-то образом отличается от другой версии. Для определения того, является ли что-то вариантом, обычно выбирается эталонная версия, а вариант отличается от этой эталонной версии. В некоторых вариантах осуществления вариант может иметь такой же или другой (*например, повышенный или пониженный*) уровень активности или функциональности, чем последовательность дикого типа. Например, в некоторых вариантах осуществления вариант может иметь улучшенную

функциональность по сравнению с последовательностью дикого типа, если он, например, является оптимизированным по кодонам для противостояния деградации, например, под действием ингибирующей нуклеиновой кислоты, например, микроРНК. Такой вариант упоминается в данном документе как вариант с приобретением функции. В некоторых вариантах осуществления вариант характеризуется снижением или устранением активности или функциональности или изменением активности, что приводит к отрицательному результату (например, повышение электрической активности, приводящее к хронической деполяризации, что приводит к гибели клеток). Такой вариант упоминается в данном документе как вариант с потерей функции. Например, в некоторых вариантах осуществления последовательность гена представляет собой последовательность дикого типа, которая кодирует функциональный белок и существует у большинства представителей видов с геномами, содержащими ген. В некоторых таких вариантах осуществления вариант с приобретением функции может представлять собой последовательность гена, которая содержит одно или более нуклеотидных отличий по сравнению с последовательностью гена дикого типа. В некоторых вариантах осуществления вариант с приобретением функции представляет собой оптимизированную по кодомам последовательность, которая кодирует транскрипт или полипептид, который может иметь улучшенные свойства (например, меньшую восприимчивость к деградации, например, меньшую восприимчивость к деградации, опосредованной микроРНК), чем соответствующий дикий тип (например, не оптимизированная по кодомам) версия. В некоторых вариантах осуществления вариант с потерей функции имеет одно или более изменений, которые приводят к тому, что транскрипт или полипептид является каким-либо образом дефектным (например, сниженная функция, нефункционирование) по сравнению с транскриптом и/или полипептидом дикого типа.

[0129] *Ингибитор VEGF*. В контексте данного документа термин «ингибитор VEGF» используется взаимозаменяемо с термином «анти-VEGF белок».

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0130] **На фиг. 1** представлена схема репрезентативной анатомии человеческого уха, включая распространенные области возникновения вестибулярной шванномы (ВШ).

[0131] **На фиг. 2** представлено графическое изображение расположения ВШ (шириной менее 5 мм) во внутреннем слуховом проходе. В этом анализе большинство небольших внутриканальных ВШ (расположенных полностью во внутреннем слуховом проходе) были

расположены вблизи дна внутреннего слухового прохода (например, в миллиметрах от основания улитки), на основании измерений, полученных с помощью снимков МРТ (Коеп 2020, которая полностью включена в данный документ в посредством ссылки). Когда происхождение этих 38 опухолей было локализовано в латеральной, средней и медиальной третях длины внутреннего слухового прохода, 60% возникали в латеральной трети (прилегающей к внутреннему уху) (Коеп 2020, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки); в ходе анализа распределения этих опухолей в зависимости от процента длины внутреннего слухового прохода (нормированного на незначительные колебания длины внутреннего слухового прохода [мм] у разных индивидуумов), ~85% площади под кривой находилось в пределах латеральной (прилегающей к внутреннему уху) половины внутреннего слухового прохода (Коеп 2020, которая полностью включена в данный документ путем ссылки).

[0132] На **фиг. 3А-3В** представлено схематическое изображение внутреннего уха, показывающее непрерывность циркуляции перилимфы между вестибулярной системой слева и улиткой (барабанная лестница, лестница преддверия) справа. Как показано на **фиг. 3А-3В** предварительной заявки на патент США 63/152 832 (содержание которой полностью включено в данный документ посредством ссылки), перилимфа показана светло-фиолетовым цветом. На **фиг. 3А** представлена схема свернутой в спираль улитки. Количество показанных поворотов улитки является репрезентативным для внутреннего уха мыши. На **фиг. 3В** представлена схема, показывающая поперечное сечение улитки. На схеме барабанная лестница и лестница преддверия заполнены перилимфой, а средняя лестница заполнена эндолимфой (Talaei 2019, полностью включена в данный документ посредством ссылки).

[0133] На **фиг. 4А-4В** представлено схематическое изображение описанного в данном документе способа введения. На **фиг. 4А** представлено изображение устройства для доставки, как описано в данном документе (Приложение А, которое полностью включено в данный документ посредством ссылки). Устройство для доставки, как показано, предназначено для внутрикохлеарного введения вводимой жидкости через мембрану круглого окна со стопором для регулирования глубины введения. Стопор показан зеленым цветом на **фиг. 4А** предварительной заявки на патент США 63/152 832, содержание которой полностью включено в данный документ посредством ссылки. На **фиг. 4В** представлено изображение, показывающее ожидаемый поток введенной жидкости через барабанную лестницу в лестницу преддверия (через сообщение в геликотреме на вершине улитки), а затем из улитки через отверстие, расположенное в основании стремени устройства для

доставки в пределах овального окна. (Talei 2019, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки).

[0134] На **фиг. 5A-5B** представлено схематическое изображение упрощенной конструкции эндогенного AAV (**фиг. 5A**) и упрощенной конструкции рекомбинантного AAV (rAAV) (**фиг. 5B**).

[0135] На **фиг. 6A-6D** представлена серия схематических изображений иллюстративных конструкций rAAV, описанных в данном документе. На **фиг. 6A** представлена иллюстративная конструкция rAAV-анти-VEGF, которая содержит, *среди прочего*, последовательности, кодирующие переменный домен тяжелой цепи иммуноглобулина и переменный домен легкой цепи иммуноглобулина, разделенные последовательностью, кодирующей саморасщепляющийся пептид. Такая конструкция упоминается в данном документе как «конструкция V_H/V_L» или «конструкция rAAV-V_H/V_L». Примеры rAAV-V_H/V_L включают rAAV-ранибизумаб и rAAV-ранибизумаб-PC, которые представляют собой rAAV-V_H/V_L, кодирующие ранибизумаб. На **фиг. 6B** представлена иллюстративная конструкция rAAV-анти-VEGF, которая содержит, *среди прочего*, последовательности, кодирующие переменный домен тяжелой цепи иммуноглобулина, необязательный константный домен тяжелой цепи иммуноглобулина, переменный домен легкой цепи иммуноглобулина, необязательный переменный домен легкой цепи иммуноглобулина и зеленый флуоресцентный белок (GFP). Каждый из этих компонентов может быть разделен последовательностью, кодирующей саморасщепляющийся пептид. Такая конструкция может упоминаться как «конструкция ABGFP» или «конструкция rAAV-ABGFP». Примеры rAAV-ABGFP включают rAAV-ранибизумаб-GFP и rAAV-бевацизумаб-GFP, которые представляют собой rAAV-ABGFP, кодирующие ранибизумаб или бевацизумаб. На **фиг. 6C** представлена иллюстративная конструкция rAAV-анти-VEGF, которая содержит, *среди прочего*, последовательности, кодирующие тяжелую цепь иммуноглобулина (включающую переменный домен тяжелой цепи иммуноглобулина и константный домен тяжелой цепи иммуноглобулина) и легкую цепь иммуноглобулина (включающую переменный домен легкой цепи иммуноглобулина и константный домен легкой цепи иммуноглобулина), причем цепи разделены последовательностью, кодирующей саморасщепляющийся пептид. Такая конструкция упоминается в данном документе как «конструкция АВ» или «конструкция rAAV-AB». Примеры rAAV-AB включают rAAV-бевацизумаб и rAAV-бевацизумаб-PC, которые представляют собой rAAV-AB, кодирующие бевацизумаб. На **фиг. 6D** представлена иллюстративная конструкцию rAAV, которая содержит, *среди прочего*, последовательности, кодирующие

часть внеклеточного домена 1 рецептора VEGF, внеклеточного домена 2 рецептора VEGF и Fc иммуноглобулина гамма человека (IgG). Такая конструкция может упоминаться как «конструкция VEGF TRAP» или «конструкция гAAV-TRAP». Примеры гAAV-TRAP включают гAAV-афлиберцепт и гAAV-афлиберцепт-PC, которые представляют собой гAAV-TRAP, кодирующие афлиберцепт.

[0136] На **фиг. 7** представлен вестерн-блоттинг, показывающий экспрессию клеток НЕК различными анти-VEGF белками, ранибизумабом и бевацизумабом, с использованием трансфекции или трансдукции иллюстративных конструкций гAAV-анти-VEGF, описанных в данном документе. Дорожки отмечены вдоль верхней части фигуры, а прогнозируемые размеры белка отмечены слева от фигуры. Дорожки 2–8 содержат восстановленные белки, а дорожки 10–16 содержат невосстановленные белки. Дорожка 1: набор предварительно окрашенных белковых маркеров PageRuler™. Дорожка 2: нетрансфицированный/отрицательный контроль. Дорожка 3: трансфекция конструкцией гAAV-бевацизумаб-PC. Дорожка 4: трансфекция конструкцией гAAV-ранибизумаб-GFP. Дорожка 5: трансфекция конструкцией гAAV-ранибизумаб-PC. Дорожка 6: трансдукция частицей гAAVAnc80-бевацизумаб-PC с множественностью заражения (MOI) $7,5 \times 10^4$. Дорожка 7: трансдукция частицей гAAVAnc80-бевацизумаб-PC с MOI $2,2 \times 10^5$. Дорожка 8: трансдукция частицей гAAVAnc80-бевацизумаб-PC с MOI $5,5 \times 10^5$. Дорожка 9: набор предварительно окрашенных белковых маркеров PageRuler™. Дорожка 10: нетрансфицированный/отрицательный контроль. Дорожка 11: трансфекция конструкцией гAAV-бевацизумаб-PC. Дорожка 12: трансфекция конструкцией гAAV-ранибизумаб-GFP. Дорожка 13: трансфекция конструкцией гAAV-ранибизумаб-PC. Дорожка 14: трансдукция частицей гAAVAnc80-бевацизумаб-PC с MOI $7,5 \times 10^4$. Дорожка 15: трансдукция частицей гAAVAnc80-бевацизумаб-PC с MOI $2,2 \times 10^5$. Дорожка 16: трансдукция частицей гAAVAnc80-бевацизумаб-PC с MOI $5,5 \times 10^5$.

[0137] На **фиг. 8A-8D** представлена серия графиков, показывающих аффинность некоторых описанных в данном документе анти-VEGF белков, измеренную с помощью биосенсорного прибора Octet® HTX с использованием аналитического программного обеспечения Octet®, Data Analysis HT10.0. На **фиг. 8A** представлен график, показывающий аффинность контрольного мышинового моноклонального антитела к VEGF человека (MmAb к VEGF) в буфере с использованием рекомбинантного человеческого VEGF в качестве связывающего агента. В этом анализе MmAb к hVEGF готовили в КС в концентрации 100 мкг/мл, затем разводили до конечной концентрации 10 мкг/мл в 1x кинетическом буфере. На **фиг. 8B** представлен график, показывающий аффинность секретируемых белков в

культуральной среде из клеток НЕК, трансфицированных конструкцией гAAV-ранибизумаб-PC, соответствующей SEQ ID NO: 90, с использованием рекомбинантного VEGF человека в качестве связывающего агента. **На фиг. 8C** представлен график, показывающий аффинность секретируемых белков в культуральной среде из клеток НЕК, трансфицированных конструкцией гAAV-бевацизумаб-PC, соответствующей SEQ ID NO: 93, с использованием рекомбинантного VEGF человека в качестве связывающего агента. **На фиг. 8D** представлен график, показывающий аффинность секретируемых белков в контрольной культуральной среде (КС) из клеток НЕК, которые не были трансфицированы рекомбинантным VEGF человека в качестве связывающего агента.

[0138] **На фиг. 9** представлено графическое изображение реконструкции филогенеза и предковой последовательности эволюционной линии AAV. Дендрограмма моделирует эволюционный путь AAV с ранней спецификацией AAV4 и 5 серотипов параллельно одному узлу, названному Anc80. Незаштрихованные круги со сплошными линиями представляют эволюционные промежуточные продукты, реконструированные посредством реконструкции предковой последовательности. Незаштрихованный круг с пунктирной линией представляет собой библиотеку вероятностного пространства последовательностей вокруг варианта AAVAnc80. Субклады объединены для наглядности (Zinn 2015, полностью включена в данный документ посредством ссылки).

[0139] **На фиг. 10** представлено схематическое изображение структурного моделирования поверхности капсида AAVAnc80. Структурное картирование аминокислотных изменений по сравнению с AAV2 (слева) и AAV8 (справа) на тримере VP1 с визуализацией внешней (вверху) и внутренней (внизу) части вириона. В AAVAnc80 есть несколько расходящихся остатков, а в Anc80Lib несколько неоднозначных и, следовательно, диморфных остатков (Zinn 2015, полностью включена в данный документ посредством ссылки). Как показано на **фиг. 10** предварительной заявки на патент США 63/152 832 (полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки), расходящиеся остатки показаны синим цветом, а неоднозначные и диморфные остатки показаны красным.

[0140] **На фиг. 11** представлены репрезентативные флуоресцентные изображения, демонстрирующие кохлеарную трансдукцию *in vivo* встречающихся в природе серотипов AAV и варианта AAVAnc80 AAV у новорожденных мышей посредством доставки через мембрану круглого окна. Мышам (P1) вводили различные капсиды AAV (AAV1, AAV2, AAV8, AAV6 [не показаны] и AAVAnc80), содержащие конструкцию, кодирующую усиленный GFP (eGFP). Актин, меченный фаллоидином, показан красным цветом на **фиг.**

11 предварительной заявки на патент США 63/152 832, полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки. Количественный анализ eGFP-положительных внутренних волосковых клеток (ИНС) и наружных волосковых клеток (ОНС) показал эффективность трансдукции приблизительно от 90 до 100% от основания к вершущке после доставки гAAVAnc80, содержащей конструкцию, кодирующую усиленный GFP (гAAVAnc80-eGFP). (Landegger 2017, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки).

[0141] **На фиг. 12** представлены репрезентативные флуоресцентные изображения, демонстрирующие вестибулярную трансдукцию частиц гAAVAnc80 *in vivo* у новорожденных мышей посредством доставки через мембрану круглого окна. Мышам (P1) вводили AAVAnc80-eGFP и проводили мечение актина посредством окрашивания фаллоидином. eGFP показан зеленым цветом, а фаллоидин показан красным цветом на **фиг. 12** предварительной заявки на патент США 63/152 832, полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки. Трансдукция наблюдалась в волосковых клетках маточки как типа I, так и типа II (**панель (A)**), а также клетки кристаты полукружного канала на (**панель (B)**) (Landegger 2017, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки).

[0142] **На фиг. 13** представлены репрезентативные флуоресцентные изображения, демонстрирующие кохлеарную трансдукцию частиц гAAVAnc80 *in vivo* у взрослых мышей посредством доставки в задний полукружный канал. Мышам (в возрасте 7 недель) вводили частицы гAAVAnc80-eGFP. На **панели (A)** включено изображение с малым увеличением срединно-модиолярного среза инъецированной улитки, показывающее сигнал eGFP в ИНС, обозначенных на панели как (I), ОНС, обозначенных на панели как (O), спиральном лимбе, обозначенном как (SL), мембране Рейсснера, обозначенной как (RM), и спиральном ганглии, обозначенном как (SG). На **панели (B1)** и **панели (B2)** представлены изображения кортиева органа с большим увеличением из апикальной (**панель (B1)**) и средней (**панель (B2)**) областей улитки. Количественная оценка eGFP-положительных клеток показала, что приблизительно 100% ИНС были трансдуцированы, в то время как трансдукция ОНС уменьшалась от вершущки к основанию. На **панели (C)** представлено изображение с малым увеличением, показывающее, что сигнал eGFP был обнаружен в подмножестве клеток (нейронах и сателлитных глиальных клетках) в спиральном ганглии (Suzuki 2017, полностью включена в данный документ посредством ссылки). Цветные изображения панелей, представленных на этой фигуре, показаны на **фиг. 13** предварительной заявки на патент США 63/152 832, полное содержание которой включено в данный документ

посредством ссылки.

[0143] На **фиг. 14** представлены репрезентативные флуоресцентные изображения, демонстрирующие вестибулярную трансдукцию гAAVAnc80-eGFP *in vivo* у взрослых мышей посредством доставки в задний полукружный канал. Мышам (в возрасте 7 недель) вводили гAAVAnc80-eGFP. На **панели (A1)** и **панели (A2)** представлен вид сечения преддверия с малым увеличением, показывающий сигнал eGFP как в маточке, так и в мешочке. На **панели (B)** и **панели (C)** представлены виды с большим увеличением срезов вестибулярных концевых органов (**панель (B)**: маточка; **панель (C)**: ампулярный гребешок), демонстрирующие экспрессию eGFP в поддерживающих клетках и волосковых клетках. Заштрихованные стрелки указывают пример трансдуцированных поддерживающих клеток (волосковые клетки не указаны) (Suzuki 2017, полностью включена в данный документ посредством ссылки). Цветные изображения панелей, представленных на этой фигуре, показаны на **фиг. 14** предварительной заявки на патент США 63/152 832, полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки.

[0144] На **фиг. 15** представлены репрезентативные флуоресцентные изображения, демонстрирующие кохлеарную и вестибулярную трансдукцию *in vivo* встречающегося в природе серотипа AAV2 по сравнению с вариантом гAAVAnc80 у взрослых мышей посредством доставки через мембрану круглого окна с фенестрацией канала. Мышам (в возрасте 4 недель) вводили различные частицы AAV (в данном документе показаны AAV2 и гAAVAnc80; AAV1, AAV8 и AAV9 не показаны), кодирующие eGFP. По сравнению с AAV2 трансдукция, опосредованная гAAVAnc80, показала сопоставимые скорости трансдукции ИНС и ОНС (**панель (A1) по сравнению с панелью (A2)**), но более широкую трансдукцию клеток спирального ганглия (**панель (B1) по сравнению с панелью (B2)**) и волосковых клеток мешочка (**панель (C1) по сравнению с панелью (C2)**: тотальные препараты; **панель (D1) по сравнению с панелью (D2)**: срезы) (Omichi 2020, полностью включенная в данный документ посредством ссылки). Цветные изображения панелей, представленных на этой фигуре, показаны на **фиг. 15** предварительной заявки на патент США 63/152 832, полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки.

[0145] На **фиг. 16A-16B** представлены графические изображения экспрессии РНК в эксплантатах улитки и экспрессии секретируемого белка в средах эксплантатов улитки после трансдукции эксплантатов улитки новорожденных мышей дикого типа (P2) частицами гAAVAnc80, содержащими анти-VEGF белки, как описано в данном документе

(гAAVAnc80-анти-VEGF). Частицы гAAVAnc80-бевацизумаб-РС (конструкция в соответствии с SEQ ID NO: 93) или частицы гAAVAnc80-ранибизумаб-РС (конструкция в соответствии с SEQ ID NO: 90) трансдуцировали клетки в кохлеарных эксплантатах мышей дикого типа и вызывали экспрессию и секрецию мРНК, кодирующей анти-VEGF белки. **На фиг. 16А** представлен анализ экспрессии РНК и демонстрируется экспрессия мРНК, кодирующей ранибизумаб и бевацизумаб, в клетках эксплантатов, получавших гAAVAnc80-ранибизумаб-РС или гAAVAnc80-бевацизумаб-РС, соответственно. Экспрессия не была обнаружена в эксплантатах, получавших несущую среду. Результаты представлены как среднее значение + СО. **На фиг. 16В** изображено количественное определение ранибизумаба, опосредованное Meso Scale Discovery (MSD), обнаруженного в среде эксплантатов, получающих различные концентрации (1,4E10, 2,8E10 или 4,2E10 вг) частиц гAAVAnc80-ранибизумаб-РС; ранибизумаб был обнаружен в среде эксплантатов, получавших частицы гAAVAnc80-ранибизумаб-РС, но не был обнаружен в эксплантатах, получавших несущую среду. Незаштрихованные круги указывают на концентрацию ранибизумаба в отдельных образцах (n=4/группа), а линии представляют среднее значение.

[0146] **На фиг. 17** представлены репрезентативные изображения флуоресцентного окрашивания с малым увеличением из первого исследования (называемого в данном документе «Исследование 1»), демонстрирующие внутреннее ухо мышей линии CBA/CaJ, трансдуцированных частицами гAAVAnc80-анти-VEGF, как описано в данном документе. Изображения представляют собой репрезентативные микрофотографии улитки, а именно микродиссекции среднего витка улитки после внутрикохлеарного введения частиц гAAVAnc80-ранибизумаб-РС (конструкция в соответствии с SEQ ID NO: 90) в количестве 1,4E10 вг/улитку, гAAVAnc80-бевацизумаб-РС (конструкция в соответствии с SEQ ID NO: 93) частицы в количестве 1,2E10 г/улитку или контроля в виде несущей среды. Сенсорный эпителий подвергали иммуноокрашиванию первичными антителами к фаллоидину, маркеру волосковых клеток (который также демонстрирует слабое неспецифическое мечение спирального лимба на этих микрофотографиях) и ранибизумабом («анти-Fab окрашивание») для обнаружения экспрессии анти-VEGF белка. Как показано на **фиг. 17** предварительной заявки на патент США 63/152 832 (полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки), фаллоидин показан красным цветом, а ранибизумаб показан зеленым цветом. Человеческое антитело к ранибизумабу использовали для обнаружения Fab-сегмента белков, который является общим для ранибизумаба и бевацизумаба. Четкое мечение было обнаружено в ИНС и поддерживающих клетках латеральнее ОНС. Фоновое окрашивание было обнаружено в области нервных

волокон улитки (например, мечение нейронных волокон было очевидным как для улитки, в которую вводили частицы, так и для улитки, в которую вводили несущую среду), что препятствует достоверной оценке экспрессии в этой конкретной области.

[0147] На **фиг. 18** представлены репрезентативные изображения флуоресцентного окрашивания из исследования 1, демонстрирующие внутреннее ухо мышей линии CBA/CaJ, трансдуцированных частицами gAAVAnc80-ранибизумаб-PC (конструкция в соответствии с SEQ ID NO: 90) в количестве $1,4E10$ г/улитка или gAAVAnc80-бевацизумаб-PC (конструкции в соответствии с SEQ ID NO: 93) частиц в количестве $1,2E10$ г/улитку по сравнению с контролями, которым не вводили и/или вводили несущую среду. ИНС и ОНС иммуноокрашивали антителами к миозину VIIa и визуализировали в областях 8, 16 и 32 кГц с использованием опубликованной кохлеограммы (Viberg and Canlon, 2004, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки). Изображения контрольных ушей, в которые не проводили инъекции, получены из ушей, противоположных контрольным ушам, в которые вводили несущую среду. Масштабная линейка = 20 мкм. Цветные изображения панелей, представленных на этой фигуре, показаны на **фиг. 18** предварительной заявки на патент США 63/152 832, полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки.

[0148] На **фиг. 19** представлены репрезентативные конфокальные изображения из исследования 1, демонстрирующие трансдуцированные волосковые клетки и нейроны для популяций мышей линии CBA/CaJ, трансдуцированных с применением gAAVAnc80-ранибизумаб-PC (конструкция в соответствии с SEQ ID NO: 90). На **панели (А)** и **панели (С)** представлены трансдуцированные клетки, иммуноокрашенные анти-Fab антителами. На **панели (В)** и **панели (D)** представлены проекции нейронов, иммуноокрашенные анти-нейрофиламентом 200. Оба образца, в которые были проведены инъекции несущей среды (**панели (А)** и **(В)**) и образцы, в которые были проведены инъекции частиц gAAVAnc80-ранибизумаб-PC (**панели (С)** и **(D)**) имеют трансдуцированные проекции нейронов в области внутренней борозды, но не в кортиевом органе. Только образцы, в которые были проведены инъекции частиц gAAVAnc80-ранибизумаб-PC, трансдуцировали внутренние и наружные волосковые клетки. Масштабная линейка = 20 мкм. Цветные изображения панелей, представленных на этой фигуре, показаны на **фиг. 19** предварительной заявки на патент США 63/152 832, полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки.

[0149] На **фиг. 20А-20В** представлены графические изображения из исследования 1, демонстрирующие гистограммы количества ИНС и ОНС у мышей CBA/CaJ,

трансдуцированных частицами гAAVAnc80-ранибизумаб-РС (конструкция в соответствии с SEQ ID NO: 90) в количестве 1,4E10 г/улитка , или гAAVAnc80-бевацизумаб-РС (конструкции в соответствии с SEQ ID NO: 93) частиц в количестве 1,2E10 г/улитку по сравнению с контролями, которым не вводили и/или вводили несущую среду. Репрезентативная совокупность наборов данных, использованных в этом анализе, показана на **фиг. 18**. На **фиг. 20А** показаны количества ОНС для неинъецированных контролей, контролей, которым проводили инъекции несущей среды, и исследуемых препаратов. На **фиг. 20В** показаны количества ИНС для контролей, которым не проводили инъекции, контролей, которым проводили инъекции несущей среды и исследуемых препаратов. Показатели для обоих **фиг. 20А** и **20В** были количественно определены и представлены в виде графика в зависимости от группы лечения и частотного диапазона. N для каждой группы составляло либо 9, либо 10 животных, а данные представлены как среднее значение +/- стандартная ошибка среднего (СОС). Количественные оценки контрольных ушей, в которые не проводили инъекции, проводили для ушей, противоположных контрольным ушам, в которые вводили несущую среду. *p<0,05, **p<0,01 и ***p<0,001 по сравнению с ухом, в которое не проводили инъекцию, за исключением скобки. Значения p были определены с помощью двухфакторного ANOVA с последующим ретроспективным анализом с применением критерия Тьюки.

[0150] На **фиг. 21А-21В** представлены графические изображения частоты трансдукции волосковых клеток (НС) и неволосковых клеток (не-НС). Репрезентативная совокупность наборов данных, использованных в этом анализе, показана на **фиг. 18**. На **фиг. 21А** показано количество волосковых клеток (НС) для контролей, которым не проводили инъекции, контролей, которым проводили инъекции несущей среды, и исследуемых препаратов. На **фиг. 21В** показано количество неволосковых клеток (не-НС) для неинъекционных контролей, контролей, которым проводили инъекции несущей среды, и исследуемых препаратов. Данные взяты из исследования 1 и являются репрезентативными для популяций мышей линии СВА/СаJ, трансдуцированных частицами гAAVAnc80-ранибизумаб-РС (конструкция в соответствии с SEQ ID NO: 90) в количестве 1,4E10 г/улитку или частицами гAAVAnc80-бевацизумаб-РС (конструкция в соответствии с SEQ ID NO: 93) в количестве 1,2E10 г/улитку. Количественное определение трансдуцированных (Fab+) волосковых клеток (**фиг. 21А**) и неволосковых клеток (**фиг. 21В**) представлено в виде графика в зависимости от группы лечения и частотного диапазона с объединенными данными для обоих полов. N для каждой группы составляло либо 9, либо 10 животных, а данные представлены как среднее значение +/- стандартная ошибка среднего (СОС).

Количественные оценки контрольных ушей, в которые не проводили инъекции, получены из ушей, противоположных контрольным ушам, в которые вводили несущую среду. Статистических сравнений не проводилось по причине вариабельности выборок.

[0151] На **фиг. 22** представлены репрезентативные изображения с большим увеличением из исследования 2, демонстрирующие флуоресцентное окрашивание кохлеарной трансдукции частицами rAAVanc80-ранибизумаб-PC (конструкция в соответствии с SEQ ID NO: 90) в количестве $1,4E10$ вг/улитку. Показаны микрофотографии улитки из трех областей улитки, в которую была проведена инъекция (63X), на которых показано мечение антителом к ранибизумабу (mAb). В каждом столбце представлены максимальные проекции посредством стеков конфокальных изображений, полученных от мыши, которой проводили инъекцию, а каждая строка представляет частотный диапазон из верхушки (8 кГц), середины (16 кГц) и основания (32 кГц) улитки. Справа от каждой строки перечислены первичные типы клеток с положительным иммуноокрашиванием. Значительное фоновое окрашивание было обнаружено в области нервных волокон улитки (например, мечение нейронных волокон было очевидным как для улитки, в которую была проведена инъекция, так и для неинъецированных улиток [неинъецированные улитки не показаны]), что препятствует достоверной оценке экспрессии в этой конкретной области. Цветные изображения панелей, представленных на этой фигуре, с мечением зеленым цветом антителом к ранибизумабу показаны на **фиг. 22** предварительной заявки на патент США 63/152 832, полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки.

[0152] На **фиг. 23** представлено графическое изображение обнаружения и количественного определения секретируемого анти-VEGF белка в сыворотке из исследования 2 после внутрикохлеарной доставки частиц rAAVanc80-ранибизумаб-PC (конструкция в соответствии с SEQ ID NO: 90) в количестве $1,4E10$ г/улитку. Анти-VEGF белок был обнаружен с использованием Meso Scale Discovery в сыворотке мышей, которым вводили частицы rAAVanc80-ранибизумаб-PC, на более высоком уровне, чем в сыворотке мышей, которым вводили несущую среду. Незаштрихованные круги указывают на концентрацию анти-VEGF белка в отдельных образцах (несущая среда, $n = 7$; ранибизумаб, $n = 9$), а линии представляют среднее значение.

[0153] На **фиг. 24** представлено графическое изображение обнаружения и количественного определения секретируемого анти-VEGF белка в спинномозговой жидкости (СМЖ) мышей из исследования 1 и после внутрикохлеарной доставки частиц rAAVanc80-ранибизумаб-PC (конструкция в соответствии с SEQ ID NO: 90) в количестве

1,4E10 г/улитку или частиц гAAV Anc80-бевацизумаб-РС (конструкция в соответствии с SEQ ID NO: 93) в количестве 1,2E10 гв/улитку. Анти-VEGF белок (ранибизумаб или бевацизумаб) обнаруживали с помощью MSD в СМЖ мышей, которым вводили частицы гAAV Anc80-анти-VEGF, но не обнаруживали в СМЖ мышей, которым вводили несущую среду. Незаштрихованные круги указывают на концентрацию анти-VEGF белка в отдельных образцах (несущая среда, n = 10; ранибизумаб, n = 9; бевацизумаб, n = 4), а линии представляют среднее значение.

[0154] На **фиг. 25** представлено графическое изображение порогов акустических стволовых вызванных потенциалов (ABR) у мышей в исследовании 1 до и после внутрикохlearной доставки частиц гAAV Anc80-ранибизумаб-РС (конструкция в соответствии с SEQ ID NO: 90) в количестве 1,4E10 гв/улитку или частиц гAAV Anc80-бевацизумаб-РС (конструкция в соответствии с SEQ ID NO: 93) в количестве 1,2E10 г/улитку. Средние пороги ABR были повышены во всех группах после внутрикохlearной операции, включая мышей, которым вводили несущую среду и частицы гAAV Anc80. Средние пороги ABR были повышены по сравнению с ABR на исходном уровне, измеренными до операции на ушах, в которые вводили частицы гAAV Anc80 и несущую среду. Планки погрешностей отображают стандартное отклонение.

[0155] На **фиг. 26A-26B** представлены графические изображения отоакустической эмиссии на частоте продукта искажения (DPOAE) у мышей в исследовании 2 и пороговых значений ABR после внутрикохlearной доставки частиц гAAV Anc80-ранибизумаб-РС (конструкция в соответствии с SEQ ID NO: 90). Кохlearная и слуховая функции (DPOAE, **фиг. 26A** и ABR, **фиг. 26B**, соответственно) продемонстрировали нормальные средние пороги у мышей, которым вводили иллюстративные частицы гAAV Anc80-ранибизумаб-РС, по сравнению с мышами, которым не проводили инъекцию. * указывает на то, что одна мышь, которой вводили частицы гAAV Anc80-ранибизумаб-РС, умерла во время проведения функциональных тестов, поэтому до этого времени у этого животного измеряли только DPOAE и chirp-вызванные ABR (ABR, вызванные импульсами с линейной модуляцией частоты); следовательно, N=2 для ABR 8, 16 и 32 кГц. Планки погрешностей отображают стандартное отклонение.

[0156] На **фиг. 27A-27B** представлены схематическое описание и графическая модель, демонстрирующие концентрацию анти-VEGF белка (смоделированную с использованием измеренных концентраций частицы гAAV Anc80-ранибизумаб, полученных у NHP (конструкция в соответствии с SEQ ID NO: 91) по сравнению с расстоянием до ВШ. На **фиг. 27A** представлена схема подхода к компьютерному моделированию: демонстрирующая

трехмерную диффузию постоянного источника анти-VEGF белка в пределах сферы объемом 90 мкл в зависимости от расстояния (в мм) от поверхности сферы, *например*, границы барабанной лестницы / дна. Расстояние от дна до медиального и латерального краев опухолей (шириной < 5 мм) оценивали на основании данных, полученных из работы Коен 2020, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки (в непосредственной близости **фиг. 2**). На **фиг. 27В** представлен консервативный подход к моделированию, показывающий, что концентрация анти-VEGF белка в перилимфе снижается в зависимости от расстояния диффузии, но остается в пределах зарегистрированного биологически активного диапазона (область между 10-100% по оси Y и 0-11 мм по оси X) вблизи опухоли во внутреннем слуховом проходе. Расчетная концентрация анти-VEGF белка варьируется в зависимости от выбора коэффициента диффузии, представленного в виде диапазона (заштрихованная область с точками) на основе трех зарегистрированных коэффициентов диффузии. Цветное изображение на **фиг. 27В** с заштрихованной областью представлено на **ФИГ. 27В** предварительной заявки на патент США 63/152,832, полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки. Биологически активный диапазон и прогнозируемый терапевтически значимый диапазон были оценены как ~ 28 нг/мл; концентрация, необходимая для ингибирования биологической активности VEGF-A на 50% в анализе клеточной пролиферации *in vitro*, составляет от 11 до 27 нг/мл, как описано в Genentech 2017, полностью включенной в данный документ посредством ссылки).

[0157] На **фиг. 28** представлены явления трансдукции внутренних волосковых клеток (ИНС) для семи NHP, которых подвергали внутрикохлеарному (RWM) введению AAVAnc80-eGFP с созданием отверстия в основании стремени (6 с одной стороны, 1 с обеих сторон), и двух NHP, которые подверглись внутрикохлеарному (RWM) введению AAVAnc80-eGFP без создания отверстия в основании стремени (с обеих сторон). Улитки анализировали на предмет экспрессии eGFP в ИНС после 3-недельного периода жизни. Эффективность трансдукции от ~ 80% до 100% может быть достигнута в ИНС макака при более высоких дозах (как видно у NHP M6-M9), в то время как при более низких дозах (как видно у NHP M1-M3) наблюдается градиент экспрессии eGFP от вершины к основанию. Только спорадическая трансдукция в области улитки в апикальных 75% улитки наблюдалась у животных, перенесших операцию без создания отверстия в основании стремени.

[0158] На **фиг. 29** показан вид в перспективе устройства для доставки жидкости во внутреннее ухо, в соответствии с аспектами настоящего раскрытия.

[0159] На **фиг. 30** показан вид сбоку подбора изогнутой иглы в соответствии с аспектами настоящего раскрытия.

[0160] На **фиг. 31** показан вид в перспективе устройства для доставки жидкости во внутреннее ухо, в соответствии с аспектами настоящего раскрытия.

[0161] На **фиг. 32** показан вид сбоку подбора изогнутой иглы, соединенной с дистальным концом устройства, в соответствии с аспектами настоящего раскрытия.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ОПРЕДЕЛЕННЫХ ВАРИАНТОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

[0162] В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к частице гAAV-анти-VEGF, предназначенной для лечения субъектов с отологическими заболеваниями, связанными с неоваскуляризацией. В определенных вариантах осуществления такое отологическое заболевание, ассоциированное с неоваскуляризацией, представляет собой вестибулярную шванному (ВШ) или доброкачественные опухоли, которые образуются в клетках вокруг преддверно-улиткового нерва во внутреннем слуховом проходе. В определенных вариантах осуществления распространенные симптомы, ассоциированные с ранней стадией ВШ, включают потерю слуха, шум в ушах и головокружение; по мере дальнейшего роста опухоли могут сдавливать ствол головного мозга, представляя собой серьезную угрозу для более серьезных показателей заболеваемости и, в редких случаях, смертности.

[0163] В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к частице гAAV-анти-VEGF, предназначенной для лечения субъектов с заболеванием внутреннего уха, например, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления заболевание внутреннего уха включает акустическую неврому, вестибулярную шванному или нейрофиброматоз II типа. В некоторых вариантах осуществления заболевание внутреннего уха представляет собой или включает акустическую неврому. В некоторых вариантах осуществления заболевание внутреннего уха представляет собой или включает вестибулярную шванному. В некоторых вариантах осуществления заболевание внутреннего уха представляет собой или включает нейрофиброматоз II типа.

[0164] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к частице гAAV-анти-VEGF, предназначенной для лечения субъектов с вестибулярной шванномой.

[0165] В определенных случаях терапия ингибиторами фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) дает возможность ослабить прогрессирующие опухоли по типу ВШ, а не использовать инвазивные альтернативные варианты, такие как хирургическая резекция и/или лучевая терапия, являющиеся современным стандартом лечения. В определенных вариантах осуществления клинические данные свидетельствуют в пользу применения системно вводимого ингибитора VEGF у пациентов с опухолями по типу ВШ с точки зрения эффективности; однако длительное системное введение ингибиторов VEGF связано со значительными проблемами безопасности. В определенных вариантах осуществления rAAV-анти-VEGF разработан и предназначен для лечения индивидуумов с ВШ путем переноса гена во внутреннее ухо для стимуляции локальной экспрессии и секреции анти-VEGF белка. В определенных вариантах осуществления заключается в том, чтобы обеспечить локальное воздействие терапевтического ингибитора VEGF (например, анти-VEGF белка, например, бевацизумаба, ранибизумаба и/или афлиберцепта) на область ВШ, тем самым ограничивая системное воздействие и сводя к минимуму возможность побочные эффекты, ассоциированных с системным введением.

[0166] В определенных вариантах осуществления кохлеарные и вестибулярные клетки внутреннего уха трансдуцируются rAAV-анти-VEGF и секретируют анти-VEGF белок в перилимфу: улитковую жидкость, которая находится в диффузионной непрерывности с интерстициальным и периневральным пространством преддверно-улиткового нерва, где локализируются опухоли ВШ. В определенных вариантах осуществления отсутствие барьеров для диффузии вдоль внутреннего слухового прохода обеспечивает потенциальный путь для терапевтического анти-VEGF белка, экспрессируемого в перилимфе, для достижения предполагаемой мишени ВШ в интерстиции нерва. В определенных вариантах осуществления трансдуцированные клетки стержня улитки располагаются так, чтобы секретировать желаемый анти-VEGF белок непосредственно в интерстициальную жидкость нерва.

[0167] В определенных вариантах осуществления возрастающие дозы композиций, описанных в данном документе (например, содержащих rAAV-анти-VEGF), вводят посредством односторонней внутрикочлеарной инъекции индивидууму (например, млекопитающему, например, пациенту-человеку, нуждающемуся в этом) с односторонней спорадически прогрессирующей ВШ. В определенных вариантах осуществления скорости роста этих опухолей переменны, и некоторые опухоли ВШ не будут прогрессировать, в определенных вариантах осуществления индивидуум (например, млекопитающее, например, человек) может быть ограничен индивидуумами с опухолями,

демонстрирующими явные признаки прогрессирования, за исключением индивидуумов с признаками стабильной опухоли при последовательных оценках результатов визуализационных исследований. В определенных вариантах осуществления скорости роста этих опухолей переменны, и некоторые опухоли ВШ не будут прогрессировать, в определенных вариантах осуществления индивидуум (например, млекопитающее, например, пациент-человек, нуждающийся в этом) может быть ограничен индивидуумами с опухолями, демонстрирующими четкие доказательства отсутствия прогрессирования, за исключением индивидуумов с признаками увеличения объема опухоли при последовательных оценках результатов визуализационных исследований.

[0168] В определенных вариантах осуществления индивидуума (например, млекопитающему, например, пациенту-человеку, нуждающемуся в этом) с более крупной опухолью(-ями) (например, опухолями, которые обладают большей способностью сдавливать ствол головного мозга) исключают из лечения композициями, описанными в данном, поскольку в некоторых вариантах осуществления, эти индивидуумы подвержены высокому риску развития потенциально опасных для жизни осложнений, связанных с опухолью, которых потенциально можно избежать с помощью современного стандарта лечения посредством хирургической резекции и лучевой терапии. В определенных вариантах осуществления лечение описанными в данном документе композициями специально предназначено для лечения индивидуумов (например, млекопитающих, например, пациента-человека, нуждающегося в этом) с более крупными опухолями (например, опухолями, которые обладают большей способностью сдавливать ствол головного мозга), поскольку в некоторых вариантах осуществления, эти индивидуумы подвержены высокому риску развития потенциально опасных для жизни осложнений, связанных с опухолью, которых потенциально можно избежать с помощью при применении описанных в данном документе композиций менее инвазивным способом и/или с большей или равной эффективностью, чем при применении современного стандарта лечения посредством хирургической резекции и лучевой терапии.

[0169] В определенных вариантах осуществления индивидуум (например, млекопитающее, например, человек) с растущими опухолями, у которого размер опухоли вряд ли будет оказывать воздействие на ствол головного мозга, может получить наибольшую пользу от вмешательства с применением композиций, описанных в данном документе (например, терапии с применением гAAV-анти-VEGF), оставаясь при этом кандидатами на будущую хирургическую резекцию и/или лучевую терапию, в случае необходимости. В определенных вариантах осуществления индивидуум (например,

млекопитающее, например, человек) с растущими опухолями, у которого размер опухоли может оказывать воздействие на ствол головного мозга, может получить наибольшую пользу от вмешательства с применением композиций, описанных в данном документе (например, терапии с применением гAAV-анти-VEGF), оставаясь при этом кандидатами на будущую хирургическую резекцию и/или лучевую терапию, в случае необходимости.

[0170] В определенном варианте осуществления в данном документе предложены способы, включающие введение во внутреннее ухо индивидуума, например, млекопитающего, например, человека, эффективного количества, например, терапевтически эффективного количества частицы гAAV, содержащей нуклеотидную последовательность конструкции, кодирующую: (a) полипептид, содержащий переменный домен тяжелой цепи антитела, функционально связанный с сигнальным пептидом, и полипептид, содержащий переменный домен легкой цепи антитела, функционально связанный с сигнальным пептидом; или (b) полипептид, содержащий антигенсвязывающий фрагмент антитела (например, Fab или scFv), функционально связанный с сигнальным пептидом.

[0171] В определенных вариантах осуществления композиции, описанные в данном документе (например, гAAV-анти-VEGF), могут вводиться хирургом-отологом в хирургическом отделении в контролируемых асептических условиях.

[0172] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложены способы повышения уровня антитела во внутреннем ухе и/или внутреннем слуховом проходе индивидуума, например, млекопитающего, например, человека, нуждающегося в этом, включающие: введение во внутреннее ухо млекопитающего эффективное количество, например, терапевтически эффективное количество частицы гAAV, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую: (a) полипептид, содержащий переменный домен тяжелой цепи антитела, функционально связанный с сигнальным пептидом, и полипептид, содержащий переменный домен легкой цепи антитела, функционально связанный с сигнальным пептидом; или (b) полипептид, содержащий антигенсвязывающий фрагмент антитела (например, Fab или scFv), функционально связанный с сигнальным пептидом; при этом введение приводит к повышению уровня антитела или антигенсвязывающего фрагмента антитела во внутреннем ухе индивидуума, например, млекопитающего, например, человека.

[0173] В некоторых вариантах осуществления в данном изобретении предложены способы лечения заболевания внутреннего уха у индивидуума, например, млекопитающего,

например, человека, нуждающегося в этом, включающие введение во внутреннее ухо млекопитающего эффективного количества, например, терапевтически эффективного количества частицы гAAV, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую: (а) полипептид, содержащий переменный домен тяжелой цепи антитела, функционально связанный с сигнальным пептидом, и полипептид, содержащий переменный домен легкой цепи антитела, функционально связанный с сигнальным пептидом; или (b) полипептид, содержащий фрагмент антигенсвязывающего антитела, связанный с сигнальным пептидом; при этом введение приводит к лечению заболевания внутреннего уха у млекопитающего.

[0174] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложены способы снижения активности VEGF во внутреннем ухе индивидуума, например, млекопитающего, например, человека, нуждающегося в этом, включающие введение во внутреннее ухо млекопитающего эффективного количества, например, терапевтически эффективное количество частицы гAAV, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую (а) полипептид, содержащий переменный домен тяжелой цепи антитела, функционально связанный с сигнальным пептидом, и полипептид, содержащий переменный домен легкой цепи антитела, функционально связанный с сигнальным пептидом; или (b) полипептид, содержащий антигенсвязывающий фрагмент антитела (например, Fab или scFv), функционально связанный с сигнальным пептидом; причем полипептид (а) кодирует антитело, которое специфически связывается с VEGF и снижает активность VEGF, полипептид (b) кодирует антигенсвязывающий фрагмент антитела, которое специфически связывается с VEGF и снижает активность VEGF; и при этом введение приводит к снижению активности VEGF во внутреннем ухе индивидуума, например, млекопитающего или человека.

[0175] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложены способы лечения отологического заболевания, связанного с неоваскуляризацией, например, акустической невромы, ВШ или нейрофиброматоза II типа во внутреннем ухе индивидуума (например, млекопитающего, например, человека), включающие: введение во внутреннее ухо индивидуума эффективного количества (например, терапевтически эффективного количества) частицы гAAV, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую (а) полипептид, содержащий переменный домен тяжелой цепи антитела, функционально связанный с сигнальным пептидом, и полипептид, содержащий переменный домен легкой цепи антитела, функционально связанный с сигнальным пептидом; или (b) полипептид, содержащий антигенсвязывающий фрагмент антитела (например, Fab или scFv), функционально связанный с сигнальным пептидом; причем полипептид (а) кодирует

антитело, которое специфически связывается с VEGF и снижает активность VEGF, полипептид (b) кодирует антигенсвязывающий фрагмент антитела, которое специфически связывается с VEGF и снижает активность VEGF; и при этом введение приводит к лечению отологического заболевания, связанного с неоваскуляризацией, например, акустической невромы или ВШ во внутреннем ухе индивидуума.

[0176] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложены способы, включающие введение во внутреннее ухо индивидуума (например, млекопитающего, например, человека) эффективного количества (например, терапевтически эффективного количества) частицы гAAV, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую растворимый рецептор VEGF, функционально связанный с сигнальным пептидом.

[0177] В некоторых вариантах осуществления в изобретении предложены способы повышения уровня растворимого рецептора VEGF во внутреннем ухе индивидуума (например, млекопитающего, например, человека), нуждающегося в этом, включающие введение во внутреннее ухо индивидуума эффективного количества (например, терапевтически эффективного количества) частицы гAAV, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую растворимый рецептор VEGF, функционально связанный с сигнальным пептидом; при этом введение приводит к повышению уровня растворимого рецептора VEGF во внутреннем ухе индивидуума.

[0178] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложены способы лечения заболевания внутреннего уха у индивидуума (например, млекопитающего, например, человека), нуждающегося в этом, включающие введение во внутреннее ухо индивидуума эффективного количества (например, терапевтически эффективного количества) частицы гAAV, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую по меньшей мере часть растворимого рецептора VEGF, функционально связанного с сигнальным пептидом; при этом введение приводит к лечению заболевания внутреннего уха у индивидуума.

[0179] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложены способы снижения активности VEGF во внутреннем ухе индивидуума (например, млекопитающего, например, человека), нуждающегося в этом, включающие введение во внутреннее ухо индивидуума эффективного количества (например, терапевтически эффективного количества) частицы гAAV, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую по меньшей мере часть растворимого рецептора VEGF, функционально

связанную с сигнальным пептидом; при этом введение приводит к снижению активности VEGF во внутреннем ухе индивидуума.

[0180] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложены способы лечения отологического заболевания, связанного с неоваскуляризацией, акустической невромой, ВШ или нейрофиброматозом 2-го типа во внутреннем ухе (включая, например, внутренний слуховой проход) индивидуума (например, млекопитающего, например, человека), которые включают введение во внутреннее ухо индивидуума эффективного количества (например, терапевтически эффективного количества) частицы гAAV, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую нуклеотидную последовательность, кодирующую по меньшей мере часть рецептора VEGF, функционально связанного с сигнальным пептидом; при этом введение приводит к лечению отологического заболевания, связанного с неоваскуляризацией, акустической невромой, ВШ или нейрофиброматозом II типа, соответственно, во внутреннем ухе индивидуума.

[0181] В других вариантах осуществления в изобретении также предложены наборы, содержащие любую из частиц гAAV, описанных в данном документе.

[0182] Дополнительные неограничивающие аспекты композиций, наборов и способов описаны в данном документе и могут использоваться в любой комбинации без ограничения.

[0183] В настоящем изобретении предложены, *среди прочего*, способы генной терапии, например, с использованием композиции, раскрытой в данном документе, для лечения лиц с отологическим заболеванием, связанным с неоваскуляризацией, например, ВШ, путем локальной экспрессии секретируемого анти-VEGF белка в клетках улитки и вестибулярной системы, находящихся в непосредственной близости и в диффузионной непрерывности с опухолевой средой ВШ во внутреннем слуховом проходе. В некоторых вариантах осуществления способ включает перенос гена в улитку с применением частицы гAAV, содержащей конструкцию, включающую в себя комплементарную ДНК (кДНК), кодирующую анти-VEGF белок (гAAV-анти-VEGF). Не желая быть связанными какой-либо теорией, считается, что в некоторых вариантах осуществления кохлеарные и вестибулярные клетки внутреннего уха, трансдуцированные гAAV-анти-VEGF (например, гAAVAnc80-анти-VEGF), могут секретировать анти-VEGF белок в перилимфу, интерстициальную и периневральную пространства преддверно-улиткового нерва (состоящие из верхнего и нижнего преддверного нервов и улиткового нерва). Большинство опухолей ВШ возникает в латеральной трети, ближайшей к улитке, внутреннего слухового прохода, в которой находится преддверно-улитковый нерв (**фиг. 1-3**). Отсутствие барьеров

для диффузии вдоль этого канала приводит к тому, что улитковый нерв омывается непрерывной жидкостью, с перилимфой на латеральном конце и СМЖ на медиальном конце; таким образом, диффузия из перилимфы в интерстиций нерва обеспечивает потенциальный путь для терапевтического анти-VEGF белка, экспрессированного в перилимфе, чтобы достичь намеченной мишени ВШ. Хотя точный механизм, с помощью которого ингибиторы VEGF приводят к контролю и регрессии опухоли, до конца не ясен, в некоторых вариантах осуществления механизмы включают снижение проницаемости сосудов и/или aberrантный ангиогенез посредством ингибирования пролиферации эндотелиальных клеток, а также нормализацию сосудистой сети опухоли (Brastianos 2009, полностью включенная в данный документ посредством ссылки).

[0184] На сегодняшний день нет известных клинических испытаний переноса генов, включающих перенос во внутреннее ухо с использованием частиц гAAV у людей; однако клиническое испытание по оценке аденовирусной частицы, содержащей конструкцию, кодирующую комплементарную ДНК (кДНК) атонального фактора транскрипции человека (Nath1), для лечения потери слуха от тяжелой до глубокой степени, было начато в 2014 г. и завершено в 2019 г. (Clinicaltrials.gov 2020a [NCT02132130], которая полностью включена в данный документ посредством ссылки).

[0185] В некоторых вариантах осуществления подход к доставке, как раскрыто в данном документе, включает синтетический капсид AAV (например, AAVAnc80) для трансдукции клеток внутреннего уха и/или устройство для направленной доставки непосредственно в улитку.

[0186] Современный стандарт лечения пациентов с ВШ включает несколько подходов и несколько целей лечения (Doherty 2006; Kaul 2018, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки). Лечение включает визуализационное исследование/наблюдение, хирургическое вмешательство и лучевую терапию. Цели лечения могут включать сохранение слуха, но часто у пациентов наблюдается полная или частичная глухота, а размер и рост опухолей могут потребовать более агрессивных вмешательств, при которых потеря слуха воспринимается как неизбежное последствие терапии. Как операция, так и лучевая терапия влекут за собой побочные эффекты; важно то, что ни один из этих вариантов лечения не связан с улучшением показателей качества жизни по сравнению с одним только наблюдением (Carlson 2015, полностью включена в данный документ посредством ссылки), поэтому существует явная потребность в менее инвазивных вариантах лечения, которые могут ослабить воздействие роста опухоли.

[0187] Клиническая эффективность системно вводимого бевацизумаба для контроля роста опухоли и связанной с ней потери слуха у пациентов с NF2 не лишена значительного риска, поскольку продолжительное проведение внутривенных инфузий, необходимых для поддержания терапевтического эффекта, также увеличивает риск серьезных осложнений; в метаанализе исследований с применением бевацизумаба для лечения NF2 совокупная частота возникновения серьезной токсичности (степень 3 или 4) составила 17% на основе метаанализа пяти популяций клинических испытаний, включающих 125 пациентов (Lu 2019, полностью включена в данный документ посредством ссылки). Гипертензия, протеинурия, повышенный уровень печеночных ферментов, артериальные тромбоэмболические явления (АТЕ), венозные тромбоэмболические явления, кровотечения, хирургические вмешательства и осложнения при заживлении ран были ассоциированы с терапией высокими дозами бевацизумаба (Chen 2009; Hanna 2019, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки). В данном документе, *среди прочего*, раскрыт альтернативный подход к лечению ВШ, который, например, не требует высоких уровней циркулирующего анти-VEGF белка (например, бевацизумаба) и в некоторых вариантах осуществления может представлять меньший риск для пациентов в отношении явлений, связанных с системным воздействием терапевтической молекулы.

[0188] В некоторых вариантах осуществления применение внутрикохлеарного пути введения для доставки rAAV-анти-VEGF во внутреннее ухо, трансдукции клеток внутреннего уха и последующей экспрессии и/или секреции анти-VEGF белка (например, бевацизумаба, ранибизумаба и/или афлиберцепта) позволяет создать устойчивое депо терапевтического препарата в непосредственной близости от опухоли. В некоторых вариантах осуществления кохлеарные и вестибулярные клетки внутреннего уха, трансдуцированные rAAV-анти-VEGF, могут секретировать анти-VEGF белок в близлежащие камеры (например, перилимфу и клетки стержня улитки, например, нейроны спирального ганглия и сателлитные глиальные клетки), и/или могут секретировать белок непосредственно в интерстициальную жидкость улиткового нерва. В некоторых вариантах осуществления отсутствие барьеров для диффузии вдоль внутреннего слухового прохода приводит к тому, что улитковый нерв находится в непрерывном потоке жидкости, с перилимфой на его латеральном конце (ближайшем к улитке, где возникает большинство опухолей ВШ [**ФИГ. 1-3**]) и СМЖ на его медиальном конце. В некоторых вариантах осуществления диффузия из перилимфы в интерстиций нерва обеспечивает потенциальный путь для терапевтического анти-VEGF белка, экспрессируемого в перилимфе, для

достижения предполагаемой мишени ВШ.

[0189] В некоторых вариантах осуществления применение внутрикохлеарного пути введения для доставки гAAV-анти-VEGF во внутреннее ухо, трансдукции клеток внутреннего уха и последующей экспрессии и/или секреции анти-VEGF белка (например, бевацизумаба, ранибизумаба и/или афлиберцепта) приводит к нетерапевтически значимым или неопределяемым уровням анти-VEGF белка в тканях, не относящихся к улитке, или в жидкостных компартментах. В некоторых вариантах осуществления анти-VEGF белок присутствует в нетерапевтически значимых или неопределяемых уровнях в сыворотке, спинномозговой жидкости, печени, селезенке, стволе головного мозга, слуховой зоне коры головного мозга, подчелюстной лимфатических узлах или их комбинации.

[0190] В некоторых вариантах осуществления локальное воздействие анти-VEGF белков на поверхность опухоли может контролировать рост опухоли, несмотря на другой путь диффузии для доступа и нейтрализации VEGF по сравнению с экстравазацией анти-VEGF белков из кровотока. Например, Lichtenbeld et al., 1999 (полностью включена в данный документ посредством ссылки) наносили анти-VEGF белки местно на опухоли у мышей и наблюдали значительное снижение сосудистой проницаемости, в частности, при снижении дозы в 20 раз по сравнению с системной дозой, которая также обеспечивала снижение сосудистой проницаемости у мышей в аналогичной степени (Yuan 1996, полностью включена в данный документ посредством ссылки).

[0191] Не желая быть связанными какой-либо теорией, в некоторых вариантах осуществления считается, что низкоуровневое, но продолжительное воздействие анти-VEGF белка в жидкости, окружающей ВШ, может стабилизировать и/или уменьшить рост опухоли с помощью различных механизмов, например, таких как снижение сосудистой проницаемости сосудов опухоли и нормализации сосудистой сети опухоли. В некоторых вариантах осуществления за счет минимизации циркулирующих уровней анти-VEGF белков локальная доставка гAAV-анти-VEGF в ухо и последующее воздействие анти-VEGF белков в микроокружении опухоли может обеспечить стойкий терапевтический эффект при минимизации риска возникновения нежелательных явлений, ассоциированных с системным введением анти-VEGF белков.

Вестибулярная шваннома (ВШ)

[0192] ВШ (также называемая акустической невромой) представляет собой доброкачественную, обычно медленно растущую опухоль (или опухоли), возникающую в результате неоплазии шванновских клеток, покрывающих преддверно-улитковый нерв

(также называемый VIII парой черепных нервов). ВШ часто возникают на верхних или нижних вестибулярных ветвях преддверно-улиткового нерва — нерва, ответственного за передачу информации о звуке и равновесии от внутреннего уха к головному мозгу (см., например, **фиг. 1–3**). Эти опухоли часто возникают во внутреннем слуховом проходе (например, в непосредственной близости от внутреннего уха) и могут распространяться в мостомозжечковый угол; они могут возникать как спорадические односторонние опухоли или, реже, как двусторонние опухоли, которые обычно возникают на фоне нейрофиброматоза 2-го типа (NF2). Частой областью возникновения ВШ является область вдоль преддверно-улиткового нерва (см., например, **фиг. 1-3**). Небольшие внутриканальцевые опухоли (шириной менее 5 мм) могут возникать, например, в латеральной трети внутреннего слухового прохода, ближайшей к улитке (Koen 2020, полностью включена в данный документ посредством ссылки).

[0193] Частые симптомы, ассоциированные с ВШ, включают потерю слуха, шум в ушах и головокружение. Поскольку опухоли продолжают расти и распространяться за пределы внутреннего слухового прохода и в пространство черепа, они могут сдавливать ствол головного мозга, что представляет серьезную проблему для более серьезных показателей заболеваемости и угрозу для выживания. Согласно современным стандартам лечения, при небольших или нерастущих опухолях может проводиться только наблюдение, в то время как при более крупных и/или прогрессирующих опухолях показана хирургическая резекция и/или лучевая терапия.

[0194] В определенных вариантах осуществления композиции и способы, описанные в данном документе, могут уменьшать и/или облегчать симптомы, ассоциированные с ВШ, и/или в комбинации с применяемыми на сегодняшний день стандартными способами лечения ВШ. Такие симптомы могут включать, но не ограничиваются ими, потерю слуха дегенерацию волосковых клеток, изменение биохимического состава жидкостей внутреннего уха, повышенный уровень внутрилабиринтного белка, эндолимфатический гидропс, обструкцию улиткового отверстия, внутрилабиринтное кровоизлияние, нарушение кровоснабжения улитки, шум в ушах, головокружение, некупируемую головную боль, невралгию лицевого нерва, невралгия тройничного нерва, паралич лицевого нерва, парестезию лицевого нерва, гидроцефалию, грыжу мозжечка и/или летальный исход.

[0195] Примечательно, что все большее число обнаруженных опухолей ВШ являются бессимптомными и выявляются у пациентов, которым проводится визуализационное исследование по другим показаниям (Reznitsky 2019, полностью включена в данный

документ посредством ссылки). В некоторых случаях симптомы ВШ могут возникать из-за сдавливания улиткового нерва и инвазии вестибулярных ветвей преддверно-улиткового нерва (VIII пара черепных нервов). Несмотря на то, что лицевой нерв часто растягивается и расширяется опухолью, лицевой паралич, как правило, встречается редко. В некоторых случаях сдавливание близлежащего тройничного нерва, отвечающего за передачу лицевой сенсорной информации в головной мозг, может привести к лицевой парестезии. Несмотря на гистологическую доброкачественность, в некоторых случаях большие опухоли могут сдавливать ствол головного мозга и приводить к гидроцефалии, грыже мозжечка и, в редких случаях, к летальному исходу.

[0196] Считается, что потеря слуха, вызванная ВШ, происходит, например, вследствие сдавливания улиткового нерва и/или кохлеарной дисфункции, что подтверждается наличием патологии улитки в большинстве случаев. Предполагается, что механизмы потери слуха, вызванной ВШ, включают, например, дегенерацию волосковых клеток, изменение биохимического состава жидкостей внутреннего уха (например, токсичные цитокины опухоли), повышенный уровень внутрилабиринтного белка, эндолимфатический гидропс, обструкцию улиткового отверстия, внутрилабиринтное кровоизлияние и/или нарушение кровоснабжения улитки (Roosli 2012; Dilwali 2015; Remenschneider 2017, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки).

[0197] Хотя современные методы лечения могут снизить риски, связанные с ростом опухоли, они не связаны со стабилизацией потери слуха или шума в ушах и часто могут приводить к нежелательным эффектам, включая одностороннюю потерю остаточного слуха, некупируемую головную боль и дефекты лицевого нерва (Pedrosa 1994; Sampath 1997; Sardhara 2020, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки). Лучевая терапия хотя и редко, но также несет в себе дополнительный риск развития вторичных злокачественных опухолей (Kapurch 2016, полностью включена в данный документ посредством ссылки). Оценки сохранения слуха после применения современных схем лечения ВШ различаются, но в крупномасштабном ретроспективном сравнении процедур хирургической резекции Ansari в своем отчете сообщил о диапазоне средней послеоперационной потери слуха от 40,6 до 82,7%, в зависимости от используемого хирургического доступа, а также размера и расположения опухоли; это включало хирургические подходы, такие как доступ через среднюю черепную ямку и ретросигмовидный доступ, которые, в зависимости от размера опухоли, могут быть предпочтительнее транслабиринтного доступа, особенно для лучшего сохранения слуха (Ansari 2012, полностью включена в данный документ посредством ссылки). В

руководствах Конгресса неврологических хирургов рекомендуется информировать пациентов, рассматривающих возможность проведения радиохирургии, микрохирургии или наблюдения, о том, что вероятность потери слуха в течение 10 лет составляет от 50 до 75%, поскольку они описывают лишь умеренно низкую вероятность (определяемую как > 25-50%) сохранения слуха в течение 10 лет при применении каждого из этих вариантов лечения (Carlson 2018, полностью включена в данный документ посредством ссылки). Ни один из доступных в настоящее время стандартных методов лечения ВШ не обеспечивает потенциального улучшения слуха.

[0198] Принятие решения о лечении спорадических ВШ является сложным. Наличие опухоли обычно подтверждается с помощью магнитно-резонансной томографии (МРТ), а первоначальный стандарт лечения зависит от тяжести симптомов и размера опухоли. На момент постановки диагноза приблизительно в 20–30% случаев размеры составляют менее 1 см, приблизительно в 30% случаев — от 1 до 2 см (включительно), а в остальных случаях (приблизительно в 40–50%) — более 2 см (Peris-Celda 2019, полностью включена в данный документ посредством ссылки). С увеличением доступности и применения МРТ-сканеров в целом эти опухоли обнаруживаются раньше (меньшего размера) и чаще на бессимптомной стадии (Reznitsky, 2019, полностью включена в данный документ посредством ссылки). В определенных вариантах осуществления в данном изобретении предложены композиции и способы, которые могут быть особенно применимы для остановки или замедления роста и/или уменьшения размеров опухолей, которые меньше 0,5 см, меньше 1 см, меньше 2 см, меньше 3 см, меньше 4 см или меньше 5 см.

[0199] В ряде случаев ВШ демонстрируют переменную и часто непредсказуемую скорость роста. Это присущее опухолям поведение еще больше осложняется переменностью методов визуализации, оценок размеров опухоли и определений роста (Kondziolka 2012, полностью включена в данный документ посредством ссылки). В то время как общий рост опухоли составляет в среднем приблизительно 1 мм/год, от 30 до 60% всех опухолей демонстрируют низкий рост или его отсутствие; в отношении растущих опухолей годовая линейная скорость составляет от 2 до 3 мм/год (Paldor 2016; Lees 2018, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки). У некоторых пациентов с небольшими опухолями лечение включает только МРТ-сканирование, а дополнительное лечение рассматривается только в том случае, если опухоль демонстрирует измеримый рост или, если симптомы ухудшаются (MacKeith 2013; Kirchmann 2017, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки). У некоторых пациентов с опухолями, которые продолжают расти и, таким

образом, представляют значительный повышенный риск возникновения осложнений, таких как сдавливание ствола головного мозга, современные варианты лечения включают хирургическую резекцию, лучевую терапию (Golfinos 2016, полностью включена в данный документ посредством ссылки) или некоторую комбинацию этих методов. Хотя эти методы лечения могут снизить риски, ассоциированные с ростом опухоли, они не ассоциируются с долгосрочной стабилизацией потери слуха (Carlson 2018, полностью включено в данный документ посредством ссылки) или уменьшением шума в ушах (Sardhara 2020, полностью включена в данный документ посредством ссылки), и часто могут приводить к нежелательным эффектам, включая одностороннюю остаточную потерю слуха, некупируемую головную боль (Pedrosa 1994, полностью включена в данный документ посредством ссылки) и дефекты лицевого нерва (Sampath 1997, полностью включена в данный документ посредством ссылки). В настоящее время около половины всех случаев ВШ в конечном итоге требуют хирургической резекции и/или лучевой терапии. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены композиции и способы, которые снижают риски, ассоциированные с ростом опухоли, такие как потеря слуха, потеря понимания речи, шум в ушах, снижение качества жизни, компрессия ствола мозга и/или летальный исход. В некоторых вариантах осуществления в данном изобретении предложены композиции и способы, которые снижают ассоциированные риски, такие как потеря слуха, дегенерация волосковых клеток, изменение биохимического состава жидкостей внутреннего уха, повышенный уровень внутрилабиринтного белка, эндолимфатический гидропс, обструкция улиткового отверстия, внутрилабиринтное кровоизлияние, нарушение кровоснабжения улитки, шум в ушах, головокружение, некупируемая головная боль, невралгия лицевого нерва, невралгия тройничного нерва, паралич лицевого нерва, парестезия лицевого нерва, гидроцефалия, грыжа мозжечка и/или летальный исход.

[0200] Несмотря на современные и недавние усовершенствования в области хирургических и лучевых методов лечения, в некоторых вариантах осуществления изобретения предпочтение отдается более консервативному подходу в виде наблюдения; до тех пор, пока опухоль не растет, это представляет собой наилучшую на сегодняшний день стратегию для сохранения оставшейся слуховой функции и минимизации потенциального нежелательного воздействия интервенционных методов лечения (MacKeith 2013; Kirchmann 2017; Torres Maldonado 2019, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки). В некоторых вариантах осуществления улучшенным вариантом лечения может быть такое лечение, которое может способствовать

стазу и/или регрессии ВШ и, таким образом, устранять необходимость в более инвазивных подходах, включая хирургическую резекцию или лучевую терапию.

[0201] В Соединенных Штатах общая заболеваемость ВШ оценивается в 1,09–1,98 новых случая на 100 000 населения; таким образом, у от 3300 до 6300 пациентов ежегодно диагностируют ВШ в США (Kshetry 2015; Ostrom 2018, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки). Увеличение числа зарегистрированных случаев заболевания в последние годы обусловлено сочетанием факторов старения населения и постоянного совершенствования технологий визуализационных исследований. Современный стандарт лечения пациентов с ВШ включает несколько подходов и несколько целей лечения (Doherty 2006; Kaul 2018, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки). Лечение включает визуализационное исследование/наблюдение, хирургическое вмешательство и лучевую терапию. Цели лечения могут включать сохранение слуха, но часто у пациентов наблюдается полная или частичная глухота, а размер и рост опухолей могут потребовать более агрессивных вмешательств, при которых потеря слуха воспринимается как неизбежное последствие терапии. Как операция, так и лучевая терапия влекут за собой побочные эффекты; важно то, что ни один из этих вариантов лечения не связан с улучшением показателей качества жизни по сравнению с одним только наблюдением (Carlson 2015, полностью включена в данный документ посредством ссылки), поэтому существует явная потребность в менее инвазивных вариантах лечения, которые могут ослабить воздействие роста опухоли.

[0202] Для многих из этих пациентов с растущими опухолями или опухолями, которые сдавливают или могут в конечном итоге сдавливать ствол головного мозга, только наблюдение может быть неприемлемым, и может потребоваться хирургическая резекция или лучевая терапия для предотвращения воздействия на неврологическую функцию. В некоторых случаях невозможно удалить всю опухоль без определенного повреждения лицевого нерва. В этих случаях часто выполняется субтотальная резекция для сохранения функции лицевого нерва; однако этот подход к лечению оставляет остаточную опухоль, которая может продолжать расти. В некоторых вариантах осуществления композиции и способы, описанные в данном документе, можно использовать в качестве комбинированной терапии в сочетании с хирургической резекцией и/или лучевой терапией. В некоторых вариантах осуществления такие подходы к комбинированной терапии снижают риск повреждения лицевого нерва или клеточного роста остаточной опухоли.

[0203] В некоторых вариантах осуществления терапевтические подходы, описанные в данном документе, с использованием описанных в данном документе композиций,

например, гAAV-анти-VEGF, фармакологически ослабляют рост опухоли, что позволяет избежать и/или минимизировать нежелательные эффекты, связанные с современными стандартными методами лечения, такими как хирургическая резекция и/или лучевая терапия.

[0204] Текущий стандарт лечения ВШ изменился за последние 2–3 десятилетия по мере совершенствования методов визуализационных исследований и улучшения способности идентифицировать и отслеживать рост опухолей. Наблюдается прогрессирующая тенденция к консервативному, наблюдательному подходу « подождать и провести повторное сканирование », с растущим пониманием того, что многие опухоли демонстрируют медленный или низкий рост и могут не влиять на слух до тех пор, пока сохраняется низкая скорость роста (MacKeith 2013; Reznitsky 2019, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки).

[0205] В определенных вариантах осуществления вмешательства, способы и/или композиции, описанные в данном документе, включают преимущества, в том числе возможность дополнить консервативные методы лечения, например, остановить рост опухоли, стабилизировать слух и/или устранить необходимость в более инвазивных методах лечения, таких как хирургическая резекция и/или лучевая терапия. Хотя прекращение роста ВШ, вероятно, обеспечит существенную клиническую пользу, также возможно, что в некоторых вариантах осуществления способы и варианты терапии с использованием описанных в данном документе композиций (например, гAAV-анти-VEGF) могут выйти за рамки стаза опухоли и привести к уменьшению размеров опухоли, восстановлению понимания речи и снижению воспринимаемой трудности понимания речи, как это продемонстрировано в исследованиях опухолей ВШ, подвергнутых лечению бевацизумабом, у пациентов с NF2 (Huang 2018; Plotkin 2019, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки). Кроме того, исследования с применением системно вводимого ингибитора VEGF показали улучшение качества жизни, связанного с NF2, включая симптомы, связанные с ВШ, у пациентов с NF2 (Plotkin 2019, полностью включена в данный документ посредством ссылки). Однако эти системные введения часто связаны с негативными побочными эффектами. Результаты этих ранних исследований могут свидетельствовать о том, что лечение анти-VEGF белком может улучшить состояние и потенциально бороться с симптомами, ассоциированными с ВШ. В определенных вариантах осуществления композиции, описанные в данном документе (например, гAAV-анти-VEGF), могут обеспечивать менее инвазивные способы лечения, а также устойчивую и локализованную экспрессию анти-VEGF белка в диффузионной

непрерывности с опухолью, потенциально обеспечивая более концентрированные и улучшенные преимущества анти-VEGF терапии без развития побочных эффектов, ассоциированных с системным лечением, у пациентов с отологическими заболеваниями, ассоциированными с неоваскуляризацией (например, ВШ).

Фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) и ингибирование VEGF при ВШ

[0206] Было обнаружено, что развитие новых кровеносных сосудов и васкуляризация являются важными факторами в ряде моделей роста опухоли и могут быть важны для роста ВШ. VEGF является одним из основных регуляторов ангиогенеза. В некоторых случаях белок VEGF и его рецепторы экспрессируются в спорадических опухолях ВШ (Cayé-Thomasen 2003; Plotkin 2009, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки), например, все опухоли, изученные в исследовании 182 резецированных спорадических опухолей ВШ экспрессировали рецепторы VEGF (Koutsimpelas 2012, полностью включена в данный документ посредством ссылки). Было показано, что в некоторых случаях уровни белка VEGF и/или экспрессии рецептора при этом типе шванномы коррелируют со скоростью роста опухоли и/или индексами роста, определенными с помощью серийных МРТ-снимков (Cayé-Thomasen 2005; Koutsimpelas 2007, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки) и с плотностью микрососудов (Koutsimpelas 2007, полностью включена в данный документ посредством ссылки), что предполагает определенную роль экспрессии VEGF при росте ВШ. Кроме того, системное лечение ингибитором VEGF (бевацизумаб) эффективно контролировало рост и улучшало слух у пациентов с NF2 и ВШ. Не желая быть связанными какой-либо теорией, считается, что применение ингибиторов VEGF может привести к контролю росту опухоли, например, роста ВШ, путем контроля роста сосудов, например, васкуляризации опухоли.

[0207] Ген VEGF кодирует фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), ранее известный как fms-подобная тирозинкиназа (Flt-1). Белок VEGF представляет собой гепарин-связывающий белок, который индуцирует миграцию и пролиферацию эндотелиальных клеток сосудов. В данном документе описаны неограничивающие примеры белковых и нуклеотидных последовательностей, кодирующих белок VEGF дикого типа.

[0208] В некоторых вариантах осуществления локальное воздействие анти-VEGF белка на поверхность опухоли может контролировать рост опухоли, несмотря на другой путь диффузии для доступа и нейтрализации VEGF по сравнению с экстравазацией анти-VEGF белка из кровотока. Например, Lichtenbeld et al., 1999 (полностью включена в данный

документ посредством ссылки) наносили анти-VEGF белок местно на опухоли у мышей и наблюдали значительное снижение сосудистой проницаемости, в частности, при снижении дозы в 20 раз по сравнению с системной дозой, которая также обеспечивала снижение сосудистой проницаемости у мышей в аналогичной степени (Yuan 1996, полностью включена в данный документ посредством ссылки). Соответственно, в некоторых вариантах осуществления композиции, описанные в данном документе (например, содержащие rAAV-анти-VEGF), обеспечивают низкоуровневую, но продолжительную экспозицию анти-VEGF белка в жидкости, окружающей ВШ, таким образом, они обладают потенциалом для стабилизации и/или снижения роста опухоли. В определенных вариантах осуществления композиции, описанные в данном документе (например, содержащие rAAV-анти-VEGF), стабилизируют и/или уменьшают рост опухоли за счет снижения проницаемости сосудов опухоли и/или нормализации сосудистой сети опухоли.

[0209] В определенных вариантах осуществления терапия анти-VEGF белком, например, как описано в данном документе, при ВШ ослабляет рост опухолей без необходимости применения инвазивных альтернативных вариантов лечения, таких как хирургическая резекция и/или лучевая терапия, таким образом, это позволяет избежать, например, осложнений хирургической резекции и/или лучевой терапии. Предполагается, что системно вводимый ингибитор VEGF (бевацизумаб) может продемонстрировать эффективность в стабилизации или уменьшении роста ВШ и последствий потери слуха у пациентов с нейрофиброматозом 2-го типа (NF2), при которых опухоли, образующиеся в результате мутаций зародышевой линии при NF2, также характеризуются высокой экспрессией VEGF и его рецепторов (Plotkin 2009; Plotkin 2012; Lu 2019, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки). Однако системное введение ингибиторов VEGF для контроля роста ВШ у пациентов с NF2 также может быть ассоциировано с побочными эффектами, при этом совокупная частота серьезной токсичности (степень 3 или 4) составляет 17% в метаанализе пяти групп участников клинических испытаний, включающих 125 пациентов (Lu 2019, полностью включена в данный документ посредством ссылки).

[0210] В определенных вариантах осуществления композиции, описанные в данном документе (например, rAAV-анти-VEGF), можно использовать в способе лечения индивидуума (например, млекопитающего, например, человека) с ВШ путем переноса гена во внутреннее ухо, например, для стимулирования экспрессии и секреции анти-VEGF белка. В определенных вариантах осуществления композиции, описанные в данном документе, например, rAAV-анти-VEGF, обеспечивают локальное воздействие, например,

во внутреннем ухе, анти-VEGF белка. В определенных вариантах осуществления локальное воздействие, например, во внутреннем ухе, анти-VEGF белка на область ВШ ограничивает системное воздействие и/или снижает, например, минимизирует потенциальные побочные эффекты. В определенных вариантах осуществления композиции, описанные в данном документе (например, гAAV-анти-VEGF), содержат ранибизумаб (48 килодальтон [кДа]), фрагмент гуманизированного моноклонального антитела (Fab), полученный из полноразмерного мышинового моноклонального антитела к VEGF человека. В определенных вариантах осуществления ранибизумаб связывается с VEGF и ингибирует связывание VEGF с его рецепторами VEGFR-1 и/или VEGFR-2, тем самым позволяет снизить трансудацию, aberrantный ангиогенез и/или рост опухоли (Genentech 2017, полностью включена в данный документ посредством ссылки).

[0211] В определенных вариантах осуществления кохлеарные и вестибулярные клетки внутреннего уха трансдуцируются композициями, описанными в данном документе (например, содержащими гAAV-анти-VEGF). В определенных вариантах осуществления эти и/или другие типы клеток могут секретировать анти-VEGF белок в перилимфу, которая представляет собой жидкость внутреннего уха, которая находится в диффузионной непрерывности с интерстициальным и периневральным пространствами преддверно-улиткового нерва, например, который состоит из верхнего и нижнего преддверных нервов и улиткового нерва, где расположена опухоль. В некоторых вариантах осуществления большинство опухолей ВШ возникает в латеральной трети (ближайшей к улитке) внутреннего слухового прохода, в котором находится преддверно-улитковый нерв. В некоторых вариантах осуществления отсутствие барьеров для диффузии вдоль этого канала приводит к тому, что улитковый нерв омывается непрерывной жидкостью, с перилимфой на латеральном конце и СМЖ на медиальном конце; таким образом, диффузия из перилимфы в интерстиций нерва обеспечивает потенциальный путь для терапевтического анти-VEGF белка, экспрессированного в перилимфе, чтобы достичь намеченной мишени ВШ (Rask-Andersen 2006, полностью включена в данный документ посредством ссылки). В некоторых вариантах осуществления нейроны спирального ганглия и/или их сателлитные глиальные клетки в стержне улитки трансдуцируются и/или трансфицируются композициями, как описано в данном документе (например, содержащими гAAV-анти-VEGF), причем эти клетки располагаются таким образом, чтобы секретировать белок непосредственно в интерстициальную жидкость улиткового нерва.

[0212] В некоторых вариантах осуществления внутрикочлеарное введение композиций, описанных в данном документе (например, гAAV-анти-VEGF), может устранить

необходимость в будущем лечении и сохранить физиологический слух у индивидуума (например, млекопитающего, например, человека) с отологическим заболеванием, ассоциированным с неоваскуляризацией (например, ВШ), независимо от основной этиологии. В некоторых вариантах осуществления внутрикохлеарное введение композиций, описанных в данном документе (например, rAAV-анти-VEGF), потенциально может отсрочить применение инвазивных подходов к лечению, таких как хирургическая резекция и/или лучевая терапия, и ассоциированную с ними потерю физиологического слуха. В некоторых вариантах осуществления за внутрикохлеарным введением композиций, описанных в данном документе (например, rAAV-анти-VEGF), следует последующее стандартное лечение. В некоторых вариантах осуществления внутрикохлеарное введение композиций, описанных в данном документе (например, rAAV-анти-VEGF), осуществляется до и/или после лучевой терапии. В некоторых вариантах осуществления введение композиций, описанных в данном документе (например, rAAV-анти-VEGF), может улучшить ответ индивидуума (например, млекопитающего, например, человека) на лучевую терапию за счет сенсбилизации опухоли и обеспечения более низкой дозы облучения (Koutsimpelas 2012; Gao 2015, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки).

[0213] Как описано выше, было обнаружено, что образование новых кровеносных сосудов и васкуляризация являются важными факторами роста ВШ (Koutsimpelas 2007; Wong 2010, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки), а VEGF является одним из основных регуляторов ангиогенеза. В дополнение к ангиогенному эффекту VEGF также обеспечивает клеточную защиту и устойчивость к апоптозу, индуцированному облучением (Koutsimpelas 2012, полностью включена в данный документ посредством ссылки). За последнее десятилетие появились клинические данные, демонстрирующие, что ингибиторы VEGF могут останавливать или обращать вспять рост ВШ. Бевацизумаб (Авастин®) в настоящее время является единственным фармакологическим препаратом, в отношении которого были продемонстрированы предварительные доказательства эффективности у пациентов с ВШ на фоне NF2.

[0214] Первоначальные клинические данные были опубликованы более десяти лет назад в оригинальной статье Plotkin et al. (Plotkin 2009, полностью включена в данный документ посредством ссылки). В этом исследовании десять пациентов с NF2 (шесть мужчин и четыре женщины со средним возрастом 25 лет) с исходным размером опухоли от 2,2 до 38,7 см³ и исходными годовыми темпами роста от 9 до 121%, и большинство из которых имело потерю слуха, системно получали бевацизумаб 5 мг/кг каждые 2 недели в

среднем в течение 12 месяцев (от 3 до 19 месяцев). После повторного введения бевацизумаба опухоли уменьшились у девяти из десяти пациентов, при этом у шести пациентов МРТ показала уменьшение объема опухоли не менее чем на 20%; ответы сохранялись у четырех из шести пациентов в течение 11–16 месяцев периода последующего наблюдения. Медиана наилучшего ответа на лечение у девяти из десяти пациентов с опухолями меньшего размера была равна уменьшению объема опухоли на 26%. Из семи пациентов, доступных для тестирования слуха, у четырех было продемонстрировано улучшение, определяемое как значительное увеличение показателя распознавания слов, у двух была продемонстрирована стабильная потеря слуха и у одного продемонстрирована прогрессирующая потеря слуха по сравнению с исходным тестированием (Plotkin 2009, полностью включена в данный документ посредством ссылки). Такие результаты могут свидетельствовать о том, что этот подход может потенциально обратить вспять прогрессирующую потерю слуха, наблюдаемую у пациентов с устойчивым ростом опухоли.

[0215] После этой первичной публикации был проведен более крупный ретроспективный обзор тридцати одного пациента с NF2, получавшего системное лечение посредством внутривенного введения бевацизумаба (5 мг/кг каждые 2 недели в течение 6–41 месяца; средняя продолжительность - 14 месяцев) (Plotkin 2012, полностью включена в данный документ посредством ссылки). В этом исследовании, проведенном на аналогичной популяции пациентов, 57% пациентов продемонстрировали улучшение слуха, определяемое как увеличение показателя распознавания слов по сравнению с исходным уровнем, а 55% продемонстрировали радиографический ответ, определяемый как уменьшение объема опухоли по меньшей мере на 20% по сравнению с исходным уровнем. При оценке долгосрочного ответа на лечение 90% пациентов имели стабильный или улучшенный слух через один год, а у 61% этих пациентов данная тенденция сохранялась через три года. Кроме того, у 88% пациентов размер опухоли был стабилен или уменьшился после одного года лечения, а у 54% этих пациентов он оставался стабильным в течение трех лет (Plotkin 2012, полностью включена в данный документ посредством ссылки).

[0216] Совсем недавно Plotkin et al. опубликовали результаты многоцентрового проспективного исследования фазы 2 по изучению эффективности системного внутривенного введения бевацизумаба у пациентов с NF2 с прогрессирующей ВШ (Plotkin 2019, полностью включена в данный документ посредством ссылки). В этом исследовании пациенты (средний возраст 23 года) получали бевацизумаб системно в течение шести месяцев в дозе 10 мг/кг каждые две недели, а затем в течение восемнадцати месяцев в дозе

5 мг/кг каждые три недели. В соответствии с полученными ранее результатами исследования промежуточные результаты испытаний показали, что через шесть месяцев после начала лечения у 41% участников наблюдалось улучшение слуха, а у 32% — рентгенологический ответ.

[0217] Предварительная эффективность и безопасность системно вводимого бевацизумаба у пациентов с NF2 и ВШ также были рассмотрены в метаанализе результатов лечения из восьми клинических испытаний, проведенных в США и Европе (Killeen 2019; Karajannis 2019; Lu 2019, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки). Были оценены результаты лечения 161 пациента с NF2 со 196 шванномами в этих восьми исследованиях, пациенты получали бевацизумаб в дозах от 5 до 10 мг/кг каждые 2 недели (для среднего диапазона продолжительности исследований от 11 до 22 месяцев). В этих исследованиях объединенные данные демонстрируют радиографический ответ (уменьшение объема по меньшей мере на 20%) приблизительно в 41% шванном, стабильность опухоли приблизительно в 47% шванном и прогрессирование опухоли (увеличение объема по меньшей мере на 20%) приблизительно в 7% шванном. У пациентов, у которых были доступны аудиометрические данные, эти дозы бевацизумаба ассоциировались с улучшением слуха приблизительно у 20% пациентов, сохранением слуха (стабилизация потери слуха) приблизительно у 69% пациентов и усилением потери слуха приблизительно у 6% пациентов. Последующее хирургическое вмешательство потребовалось у 11% пациентов в течение указанного периода последующего наблюдения. Кроме того, оценивались побочные эффекты бевацизумаба, такие как серьезная токсичность (включая гипертензию, протеинурию и аменорею). Совокупная частота серьезной токсичности (степень 3 или 4) составила 17% на основе метаанализа пяти групп участников клинических испытаний, включающих 125 пациентов (Lu 2019, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки). В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены способы и композиции, подходящие для удовлетворения давней потребности в эффективном лечении отологических заболеваний, ассоциированных с неоваскуляризацией, при этом позволяющие потенциально избежать негативных последствий, ассоциированных с системной доставкой терапевтических анти-VEGF белков.

[0218] Вышеописанная совокупность клинических данных (показывающая частоту ответа от ~30% до более чем 60% при уменьшении размера опухоли) свидетельствуют в пользу системного применения ингибиторов VEGF для снижения роста ВШ и улучшения сопутствующих симптомов потери слуха, несмотря на сопутствующие часто возникающие

побочные эффекты с системным применением ингибиторов VEGF (Plotkin 2009; Plotkin 2012; Lu 2019; Plotkin 2019, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки). Без лечения средняя скорость роста ВШ колеблется от 0,4 до 2,9 мм/год (Yoshimoto 2005, полностью включена в данный документ посредством ссылки), при этом сообщалось, что спонтанное уменьшение опухоли составляет от нуля до 11% опухолей в исследованиях с участием 212 пациентов (Tschudi 2000; Slattery 2004; Peyre 2013; Schnurman 2019, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки) или 3,8% опухолей в крупном исследовании с участием 1261 пациента (Huang 2013, полностью включена в данный документ посредством ссылки). Ограничением системной терапии анти-VEGF белками до настоящего времени была неизбежность нежелательных системных эффектов. В определенных вариантах осуществления в изобретении предложены способы введения анти-VEGF белка. В определенных вариантах осуществления предложены способы и композиции, в которых применяется механизм доставки аденоассоциированного вируса (AAV). В определенных вариантах осуществления такой AAV включает рекомбинантную конструкцию и называется рекомбинантным AAV (rAAV). Варианты осуществления таких конструкций более подробно описаны ниже. В определенных вариантах осуществления предложены композиции для локализованной доставки анти-VEGF белков, например, rAAV-анти-VEGF, в улитку, например, в непосредственной близости от места расположения опухоли, например, ВШ. В некоторых вариантах осуществления введение ингибитора VEGF, например, rAAV-анти-VEGF, в улитку снижает вероятность возникновения побочных эффектов, ассоциированных с системной доставкой ингибиторов VEGF.

[0219] Несмотря на их неадекватность в оценке диапазона биологически активных доз частиц для генной терапии, доставляемых внутрикохлеарным путем введения для лечения ВШ, несколько мышинных моделей были использованы для получения данных, подтверждающих биологическое правдоподобие ингибиторов VEGF в снижении проницаемости сосудов опухоли. Используя модель черепного окна, Yuan et al. трансплантировали различные линии опухолевых клеток человека, а затем вводили внутривенно в виде болюсной дозы либо нейтрализующее антитело к VEGF/VPF (фактор проницаемости сосудов), либо фосфатно-солевой буфер в качестве контроля (Yuan 1996, полностью включена в данный документ посредством ссылки). Они показали, что проницаемость сосудов опухоли для альбумина в группах, получавших антитела, была ниже, чем в контрольной группе, и что сосуды опухоли становились меньше в диаметре и в конечном итоге исчезали после последовательных обработок. Эти данные

демонстрируют, что проницаемость сосудов опухоли может быть снижена путем нейтрализации эндогенного VEGF/VPF (Yuan 1996, полностью включена в данный документ посредством ссылки). Совсем недавно, используя как модель седалищного нерва, так и модель внутричерепного окна, Gao et al. охарактеризовали механизм лечения анти-VEGF белком при двусторонней ВШ (Gao 2015, полностью включена в данный документ посредством ссылки). Этой группе вводили клетки шванномы человека HEI193 либо в оболочку седалищного нерва мыши, либо между мягкой и паутинной мозговыми оболочками правого полушария мышей с имплантированным черепным окном. После того, как размер опухоли достигал 4 мм в диаметре, ингибитор VEGF бевацизумаб вводили в дозе 5 мг/кг/неделю внутривенно (в/в). Полученные данные показали, что бевацизумаб уменьшал отек опухоли, улучшал неврологическую функцию и временно нормализовал сосудистую сеть опухоли у мышей.

[0220] Эти исследования предоставляют данные, подтверждающие научное обоснование использования ингибиторов VEGF для замедления прогрессирования шванном у мыши, которые согласуются с предварительными клиническими данными, полученными у пациентов с NF2, получавших системное лечение препаратом Авастин® (Plotkin 2009; Plotkin 2012; Lu 2019; Plotkin 2019, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки). Одним из ограничений этих предшествующих исследований является то, что они не отражают устойчивые уровни воздействия в ограниченной целевой зоне.

[0221] В определенных вариантах осуществления способы и композиции, раскрытые в данном документе (например, содержащие rAAV-анти-VEGF), приводят к устойчивым уровням ингибитора VEGF в ограниченной целевой зоне, например, во внутреннем ухе. Не желая быть связанными какой-либо теорией, считается, что композиции, раскрытые в данном документе, например, ингибиторы VEGF, могут проникать в опухолевые клетки ВШ путем прямого поглощения из окружающей жидкости, которая находится в непрерывной связи с перилимфатическим отделом внутреннего уха через интерстиций нерва, из которой во внутреннее ухо может диффундировать анти-VEGF белок. У мышей-опухоленосителей анти-VEGF белок, нанесенный местно на опухолевые ткани, а не введенный через кровоток, приводил к благоприятным эффектам, таким как снижение проницаемости сосудов (Lichtenbeld 1999, полностью включена в данный документ посредством ссылки).

[0222] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены способы и композиции, подходящие для доставки ингибиторов VEGF,

например, гAAV-анти-VEGF, локально в область опухоли. В некоторых вариантах осуществления эти способы и композиции потенциально способны поддерживать преимущества контроля роста опухоли с помощью анти-VEGF белка, при этом потенциально минимизируя риск развития серьезной токсичности, которая была задокументирована при системном введении ингибитора VEGF. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены способы и композиции, подходящие для трансдукции клеток внутреннего уха. В некоторых вариантах осуществления трансдукция клеток внутреннего уха может обеспечить длительную экспрессию анти-VEGF белка в области опухоли и/или рядом с этой областью при минимальном системном воздействии.

Полинуклеотидные последовательности VEGF

[0223] Помимо прочего, в настоящем изобретении предложены полинуклеотиды, например, полинуклеотиды, содержащие ген VEGF или его характерную часть, а также композиции, включающие такие полинуклеотиды, и способы с применением таких полинуклеотидов и/или композиций.

[0224] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, содержащий ген VEGF или его характерную часть, может представлять собой ДНК или РНК. В некоторых вариантах осуществления ДНК может представлять собой геномную ДНК или кДНК. В некоторых вариантах осуществления РНК может представлять собой мРНК. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит экзоны и/или интроны гена VEGF.

[0225] В некоторых вариантах осуществления генный продукт экспрессируется из полинуклеотида, содержащего ген VEGF или его характерную часть. В некоторых вариантах осуществления при экспрессии такого полинуклеотида может применяться один или более элементов контроля (например, промоторы, энхансеры, сайты сплайсинга, сайты полиаденилирования, сайты инициации трансляции и т. д.). Таким образом, в некоторых вариантах осуществления полинуклеотид по настоящему изобретению может включать один или более элементов контроля.

[0226] В некоторых вариантах осуществления ген VEGF представляет собой ген VEGF млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления ген VEGF представляет собой ген VEGF мыши. В некоторых вариантах осуществления ген VEGF представляет собой ген VEGF примата. В некоторых вариантах осуществления ген VEGF представляет собой ген VEGF человека. В некоторых вариантах осуществления ген VEGF представляет собой последовательность геномной ДНК. В некоторых вариантах осуществления ген VEGF

представляет собой последовательность РНК, которая кодирует белковый продукт. В некоторых вариантах осуществления ген VEGF представляет собой комплементарную последовательность ДНК, которая кодирует последовательность комплементарной РНК, которая кодирует белковый продукт.

[0227] В некоторых вариантах осуществления иллюстративный ген VEGF человека находится в хромосомном положении человека 6p21.1; положение в NC_000006.12 (43770209..43786487) текущей сборки 2020 года и известен как VEGF-A с идентификационным номером NCBI эталонной последовательности: NG_008732.1. В некоторых вариантах осуществления иллюстративный ген VEGF человека представляет собой последовательность кДНК, включенную в ген VEGF-A (например, вариант 1 транскрипта VEGF-A, вариант 2 транскрипта, вариант 3 транскрипта и т.д.). В некоторых вариантах осуществления иллюстративный ген VEGF человека представляет собой одну из по меньшей мере 9 известных транскрипционных изоформ VEGF-A, специалисту в данной области будет понятно, что эти транскрипционные изоформы могут подвергаться альтернативному сплайсингу с образованием альтернативных трансляционных изоформ. В некоторых вариантах осуществления иллюстративный ген VEGF-A человека представляет собой последовательность кДНК, представленную вариантом 1 транскрипта, кодирующим изоформу A VEGF (эталонная последовательность NCBI: NM_001025366.3). В некоторых вариантах осуществления иллюстративный ген VEGF-A человека представляет собой последовательность кДНК, представленную вариантом 2 транскрипта, кодирующим изоформу B VEGF (эталонная последовательность NCBI: NM_003376.6). В некоторых вариантах осуществления иллюстративный ген VEGF-A человека представляет собой последовательность кДНК, представленную вариантом 3 транскрипта, кодирующим изоформу C VEGF (эталонная последовательность NCBI: NM_001025367.3). В некоторых вариантах осуществления иллюстративный ген VEGF-A человека представляет собой последовательность кДНК, представленную вариантом 4 транскрипта, кодирующим изоформу D VEGF (эталонная последовательность NCBI: NM_001025368.3). В некоторых вариантах осуществления иллюстративный ген VEGF-A человека представляет собой последовательность кДНК, представленную вариантом 5 транскрипта, кодирующим изоформу E VEGF (эталонная последовательность NCBI: NM_001025369.3). В некоторых вариантах осуществления иллюстративный ген VEGF-A человека представляет собой последовательность кДНК, представленную вариантом 6 транскрипта, кодирующим изоформу F VEGF (эталонная последовательность NCBI: NM_001025370.3). В некоторых вариантах осуществления иллюстративный ген VEGF-A человека представляет собой

последовательность кДНК, представленную вариантом 7 транскрипта, кодирующим изоформу G VEGF (эталонная последовательность NCBI: NM_001033756.3). В некоторых вариантах осуществления иллюстративный ген VEGF-A человека представляет собой последовательность кДНК, представленную вариантом 8 транскрипта, кодирующим изоформу H VEGF (эталонная последовательность NCBI: NM_001171622.2). В некоторых вариантах осуществления иллюстративный ген VEGF-A человека представляет собой последовательность кДНК, представленную вариантом транскрипта, кодирующим изоформу R VEGF (эталонная последовательность NCBI: NM_001204385.2).

[0228] В некоторых вариантах осуществления иллюстративный ген VEGF человека находится в хромосомном положении 11q13.1 человека, в положении NC_000011.10 (64234584..64239264) и известен как VEGF-B (эталонная последовательность NCBI: NG_029823.1). В некоторых вариантах осуществления иллюстративный ген VEGF человека представляет собой последовательность кДНК, включенную в ген VEGF-B, например, вариант транскрипта VEGF-B 167 (эталонная последовательность NCBI: NM_001243733.2) и/или вариант транскрипта 186 (эталонная последовательность NCBI: NM_003377.5).

[0229] В некоторых вариантах осуществления иллюстративный ген VEGF человека находится в хромосомном положении 4q34.1-q34.3 человека, в положении NC_000004.12 (176683538..176792922, комплемент) и известен как VEGF-C (эталонная последовательность NCBI: NG_034216.1). В некоторых вариантах осуществления иллюстративный ген VEGF человека представляет собой последовательность кДНК, включенную в ген VEGF-C, например, вариант 1 транскрипта VEGF-C (эталонная последовательность NCBI: NM_005429.5).

[0230] В некоторых вариантах осуществления иллюстративный ген VEGF человека находится в хромосомном положении Xp22.2 человека, в положении NC_000023.11 (15345596..15384413, комплемент) и известен как VEGF-D (эталонная последовательность NCBI: NG_012509.1). В некоторых вариантах осуществления иллюстративный ген VEGF человека представляет собой геномную последовательность или последовательность кДНК, включенную в ген VEGF-D, например, вариант 1 транскрипта VEGF-D (эталонная последовательность NCBI: NM_004469.5).

Последовательности белков VEGF

[0231] В определенных вариантах осуществления представляющие интерес белки представляют собой изоформы гена VEGF-A. Этот ген является членом семейства PDGF (фактор роста тромбоцитов)/VEGF (фактор роста эндотелия сосудов) (PDGF/VEGF). Он

кодирует гепарин-связывающий белок, который обычно существует в виде гомодимера, связанного дисульфидной связью. Этот фактор роста индуцирует пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток сосудов и необходим как для физиологического, так и для патологического ангиогенеза. В качестве альтернативы были описаны сплайсированные варианты транскриптов, кодирующие различные изоформы. Имеются существенные доказательства альтернативной инициации трансляции с расположенных выше не-AUG (CUG) кодонов, что приводит к образованию дополнительных изоформ. В некоторых вариантах осуществления представляющие интерес белки являются ингибиторами эндогенных функций VEGF-A.

[0232] Иллюстративная аминокислотная последовательность предшественника изоформы L-VEGF₂₀₆ человеческого VEGF-A (также известная как изоформа А) (SEQ ID NO: 1)

MTDRQTD TAPSPSYHLLPGRRTVDAAASRGQGPEPAPGGGVEGVGARGVALKLFVQL
LGCSRFGGAVVRAGEAEPGAARSASSGREEPQPEEGEEEEKEEERGPQWRLGARKPG
SWTGEEAAVCADSAPAARAPQALARASGRGGRVARRGAEESGPPHSPSRRGASRAGPG
RASET MNFLLSWVHWSLALLLYLHAKWSQAAPMAEGGGQNHHEVVKFMDVYQRSY
CHPIETLVDIFQEYPDEIEYIFKPSCVPLMRCGGCCNDEGLECVPTESNITMQIMRIKPHQ
GQHIGEMSFLQHNKCECRPKKDRARQEKKSVRGKKGKQKRKRKKSRYKSWSVYVGA
RCCLMPWSLPGPHPCGPCSERRKHLFVQDPQTCKCCKNTDSRCKARQLELNERTCRC
DKPRR

[0233] Иллюстративная аминокислотная последовательность предшественника изоформы L-VEGF₁₈₉ человеческого VEGF-A (также известная как изоформа В) (SEQ ID NO: 2)

MTDRQTD TAPSPSYHLLPGRRTVDAAASRGQGPEPAPGGGVEGVGARGVALKLFVQL
LGCSRFGGAVVRAGEAEPGAARSASSGREEPQPEEGEEEEKEEERGPQWRLGARKPG
SWTGEEAAVCADSAPAARAPQALARASGRGGRVARRGAEESGPPHSPSRRGASRAGPG
RASET MNFLLSWVHWSLALLLYLHAKWSQAAPMAEGGGQNHHEVVKFMDVYQRSY
CHPIETLVDIFQEYPDEIEYIFKPSCVPLMRCGGCCNDEGLECVPTESNITMQIMRIKPHQ
GQHIGEMSFLQHNKCECRPKKDRARQEKKSVRGKKGKQKRKRKKSRYKSWSVPCGPC
SERRKHLFVQDPQTCKCCKNTDSRCKARQLELNERTCRCDKPRR

[0234] Иллюстративная аминокислотная последовательность предшественника изоформы VEGF₁₁₁ человеческого VEGF-A (SEQ ID NO: 3)

MNFLLSWVHWSLALLLYLHAKWSQAAPMAEGGGQNHHEVVKFMDVYQRSYCHPIE

TLVDIFQEYPDEIEYIFKPSCVPLMRCGGCCNDEGLECVPTTEESNITMQIMRIKPHQGQHI
GEMSFLQHMKCECRCDKPRR

**[0235] Иллюстративная аминокислотная последовательность предшественника
изоформы VEGF₁₂₁ человеческого VEGF-A (SEQ ID NO: 4)**

MNFLLSWVHWSLALLYLHNAKWSQAAPMAEGGGQNHHEVVKFMDVYQRSYCHPIE
TLVDIFQEYPDEIEYIFKPSCVPLMRCGGCCNDEGLECVPTTEESNITMQIMRIKPHQGQHI
GEMSFLQHMKCECRPKKDRARQEKCDKPRR

**[0236] Иллюстративная аминокислотная последовательность предшественника
изоформы VEGF₁₄₅ человеческого VEGF-A (SEQ ID NO: 5)**

MNFLLSWVHWSLALLYLHNAKWSQAAPMAEGGGQNHHEVVKFMDVYQRSYCHPIE
TLVDIFQEYPDEIEYIFKPSCVPLMRCGGCCNDEGLECVPTTEESNITMQIMRIKPHQGQHI
GEMSFLQHMKCECRPKKDRARQEKKSVRGKKGQKRKRKKSRYKSWSVCDKPRR

**[0237] Иллюстративная аминокислотная последовательность предшественника
изоформы VEGF_{165A} человеческого VEGF-A (SEQ ID NO: 6)**

MNFLLSWVHWSLALLYLHNAKWSQAAPMAEGGGQNHHEVVKFMDVYQRSYCHPIE
TLVDIFQEYPDEIEYIFKPSCVPLMRCGGCCNDEGLECVPTTEESNITMQIMRIKPHQGQHI
GEMSFLQHMKCECRPKKDRARQENPCGPCSERRKHLFVQDPQTCKCCKNTDSRCKAR
QLELNERTCRCDKPRR

**[0238] Иллюстративная аминокислотная последовательность предшественника
изоформы VEGF₁₈₉ человеческого VEGF-A (SEQ ID NO: 7)**

MNFLLSWVHWSLALLYLHNAKWSQAAPMAEGGGQNHHEVVKFMDVYQRSYCHPIE
TLVDIFQEYPDEIEYIFKPSCVPLMRCGGCCNDEGLECVPTTEESNITMQIMRIKPHQGQHI
GEMSFLQHMKCECRPKKDRARQEKKSVRGKKGQKRKRKKSRYKSWSVPCGPCSERR
KHLFVQDPQTCKCCKNTDSRCKARQLELNERTCRCDKPRR

**[0239] Иллюстративная аминокислотная последовательность предшественника
изоформы VEGF₂₀₆ человеческого VEGF-A (SEQ ID NO: 8)**

MNFLLSWVHWSLALLYLHNAKWSQAAPMAEGGGQNHHEVVKFMDVYQRSYCHPIE
TLVDIFQEYPDEIEYIFKPSCVPLMRCGGCCNDEGLECVPTTEESNITMQIMRIKPHQGQHI
GEMSFLQHMKCECRPKKDRARQEKKSVRGKKGQKRKRKKSRYKSWSVYVGARCC
LMPWSLPGPHPCGPCSERRKHLFVQDPQTCKCCKNTDSRCKARQLELNERTCRCDKPR
R

[0240] В определенных вариантах осуществления представляющие интерес белки представляют собой изоформы гена VEGF-B. Этот ген кодирует член PDGF/VEGF. Члены семейства VEGF регулируют образование кровеносных сосудов и задействованы в физиологию эндотелиальных клеток. Этот член является лигандом для VEGFR-1 (рецептор 1 фактора роста эндотелия сосудов) и NRP-1 (нейропилин-1). В некоторых вариантах осуществления представляющие интерес белки являются ингибиторами эндогенных функций VEGF-B.

[0241] Иллюстративная аминокислотная последовательность предшественника изоформы VEGFB-167 человеческого VEGF-B (SEQ ID NO: 9)

MSPLLRLLLLAALLQLAPAQAPVSPDAPGHQRKVVSVIDVYTRATCQPREVVVPLTV
ELMGTVAKQLVPSCVTVQRCGGCCPDDGLECVPTGQHQVRMQILMIRYPSSQLGEMSL
EESHQCECRPKKKDSAVKPDSPRPLCPRCTQHHQRDPDPTCRRCRRRSFLRCQGRGLE
LNPDTCRCKLRR

[0242] Иллюстративная аминокислотная последовательность предшественника изоформы VEGFB-186 человеческого VEGF-B (SEQ ID NO: 10)

MSPLLRLLLLAALLQLAPAQAPVSPDAPGHQRKVVSVIDVYTRATCQPREVVVPLTV
ELMGTVAKQLVPSCVTVQRCGGCCPDDGLECVPTGQHQVRMQILMIRYPSSQLGEMSL
EESHQCECRPKKKDSAVKPDRAATPHHRPQPRSVPGWDSAPGAPSPADITHPTPAPGPS
ANAAPSTTSALTPGPAAAAADAAASSVAKGGA

[0243] В определенных вариантах осуществления представляющие интерес белки представляют собой изоформы гена VEGF-C. Белок, кодируемый этим геном, является членом семейства PDGF/VEGF. Кодируемый белок способствует ангиогенезу и росту эндотелиальных клеток, а также может влиять на проницаемость кровеносных сосудов. Белок-предшественник далее расщепляется до полностью процессированной формы, которая может связывать и активировать рецепторы VEGFR-2 и VEGFR-3. В некоторых вариантах осуществления представляющие интерес белки являются ингибиторами эндогенных функций VEGF-C.

[0244] Иллюстративная аминокислотная последовательность предшественника VEGF-C человека (SEQ ID NO: 11)

MHLLGFFSVACSLLAALLPGPREAPAAAAFESGLDLSAEPDAGEATAYASKDLEEQ
LRVSSVDELMTVLYPEYWKMYKCLRKGGWQHNREQANLNSRTEETIKFAAAHYNT
EILKSIDNEWKKTQCMPREVCIDVGKEFGVATNTFFKPPCVSVYRCGGCCNSEGLQCMN

TSTSYLSKTLFEITVPLSQGPKPVTISFANHTSCRCMSKLDVYRQVHSIIRSLPATLPQCQ
AANKTCPTNYMWNNHICRCLAQEDFMFSSDAGDDSTDGFHDICGPNKELDEETCQCVC
RAGLRPASCGRPHKELDRNSCQCVCNKLFPSQCGANREFDENTCQCVCCKRTCPRNQPL
NPGKCAECTESPQKCLKGKGFHNQTCSCYRRPCTNRQKACEPGFSYSEEVCRCVPSY
WKRPMQMS

[0245] В определенных вариантах осуществления представляющие интерес белки представляют собой изоформы гена VEGF-D. Белок, кодируемый этим геном, является членом семейства PDGF/VEGF и активен в ангиогенезе, лимфангиогенезе и росте эндотелиальных клеток. Этот секретируемый белок подвергается сложному протеолитическому созреванию с образованием множества процессированных форм, которые связывают и активируют рецепторы VEGFR-2 и VEGFR-3. Этот белок структурно и функционально подобен VEGF-C. В некоторых вариантах осуществления представляющие интерес белки являются ингибиторами эндогенных функций VEGF-D.

[0246] **Иллюстративная аминокислотная последовательность предшественника VEGF-D человека (SEQ ID NO: 12)**

MYREWVVNVFMMLYVQLVQGSSNEHGPVKRSSQSTLERSEQQIRAASSLEELLRITHS
EDWKLWRCRLRLKSFTSMDSRSASHRSTRFAATFYDIETLKVIDEEWQRTQCSPRETCV
EVASELGKSTNTFFKPPCVNVFRCGGCCNEESLICMNTSTSYISKQLFEISVPLTSVPELVP
VKVANHTGCKCLPTAPRHPYSIIRRSIQIPEEDRCSHSHKCLCPIDMLWDSNKCKCVLQEE
NPLAGTEDHSHLQEPALCGPHMMFDEDRCECVCKTPCPKDLIQHPKNCSCFECKESLET
CCQKHKLHPDTCSCEDRCPFHTRPCASGKTACAКHCRFPKEKRAAQGPHSRKNP

VEGF, VEGF-R и VEGF-связывающие белки

[0247] В некоторых вариантах осуществления представляющие интерес белки представляют собой белки, которые могут связывать VEGF. В некоторых вариантах осуществления VEGF-связывающие белки могут представлять собой антитела и/или их фрагменты или содержать их. В некоторых вариантах осуществления VEGF-связывающие белки могут представлять собой или содержать белки рецептора фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR) и/или их фрагменты.

[0248] Как описано выше, были получены данные, которые могут подтвердить биологическое правдоподобие ингибиторов VEGF в снижении проницаемости сосудов опухоли. В некоторых вариантах осуществления такие данные были получены с использованием мышиных моделей, которые использовались для получения данных, подтверждающих биологическое правдоподобие ингибиторов VEGF в снижении

проницаемости сосудов опухоли. В некоторых вариантах осуществления такие мышинные модели не являются идеальными для оценки диапазонов биологически активных доз геннотерапевтических частиц, которые доставляются внутрикохлеарным путем введения, например, для лечения ВШ. Используя модель черепного окна, Yuan et al. трансплантировали различные линии опухолевых клеток человека, а затем вводили внутривенно в виде болюсной дозы либо нейтрализующее антитело к VEGF/VPF (фактор проницаемости сосудов), либо фосфатно-солевой буфер в качестве контроля (Yuan 1996, полностью включена в данный документ посредством ссылки). Авторы показали, что проницаемость сосудов опухоли для альбумина в группах, получавших антитела, была ниже, чем в контрольной группе, и что сосуды опухоли становились меньше в диаметре и в конечном итоге исчезали после последовательных обработок. Эти данные демонстрируют, что проницаемость сосудов опухоли может быть снижена путем нейтрализации эндогенного VEGF/VPF (Yuan 1996, полностью включена в данный документ посредством ссылки). Совсем недавно, используя как модель седалищного нерва, так и модель внутричерепного окна, Gao et al. попытались охарактеризовать механизм лечения анти-VEGF белком при двусторонней ВШ (Gao 2015, полностью включена в данный документ посредством ссылки). Этой группе вводили клетки шванномы человека HEI193 либо в оболочку седалищного нерва мыши, либо между мягкой и паутинной мозговыми оболочками правого полушария мышей с имплантированным черепным окном. После того, как размер опухоли достигал 4 мм в диаметре, ингибитор VEGF бевацизумаб вводили в дозе 5 мг/кг/неделю внутривенно (в/б). Полученные данные демонстрируют, что бевацизумаб уменьшал отек опухоли, улучшал неврологическую функцию и временно нормализовал сосудистую сеть опухоли у мышей.

[0249] В совокупности эти исследования предоставляют данные, подтверждающие научное обоснование использования ингибиторов VEGF для замедления прогрессирования шванном у мыши, которые согласуются с предварительными клиническими данными, полученными у пациентов с NF2, получавших системное лечение препаратом Авастин® (Plotkin 2009; Plotkin 2012; Lu 2019; Plotkin 2019, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки). Одним из ограничений этих предшествующих исследований является то, что они не отражают устойчивые уровни воздействия в ограниченной целевой зоне.

[0250] В некоторых вариантах осуществления способы и композиции, раскрытые в данном документе, приводят к устойчивым уровням ингибитора VEGF, например, гAAV-анти-VEGF, в ограниченной целевой зоне, например, во внутреннем ухе человека,

например, млекопитающего, например, человека. Не желая быть связанными какой-либо теорией, считается, что в некоторых вариантах осуществления ингибитор VEGF может проникать в опухолевые клетки ВШ путем прямого поглощения из окружающей жидкости, которая находится в непрерывной связи с перилимфатическим отделом внутреннего уха через интерстиций нерва, из которой во внутреннее ухо может диффундировать анти-VEGF белок. У мышей-опухоленосителей анти-VEGF белок, нанесенный местно на опухолевые ткани, а не введенный через кровоток, приводил к благоприятным эффектам, таким как снижение проницаемости сосудов (Lichtenbeld 1999, полностью включена в данный документ посредством ссылки).

Антитело к VEGF

[0251] В некоторых вариантах осуществления любого из антител, описанных в данном документе, указанные антитела могут связываться с антигеном VEGF (например, любым из иллюстративных белков VEGF, описанных в данном документе, например, одним или более из зрелого VEGF-A человека, зрелого VEGF-B человека, зрелого VEGF-C человека и зрелого VEGF-D человека) (например, с любой аффинностью связывания, описанной в данном документе).

[0252] В некоторых вариантах осуществления, описанных в данном документе, антитело может снижать активность VEGF (например, одного или более из любых иллюстративных белков VEGF, описанных в данном документе, например, одного или более из зрелого VEGF-A человека, зрелого VEGF-B человека, зрелого VEGF-C человека и зрелого VEGF-D человека). В некоторых вариантах осуществления антитело может блокировать VEGF (например, один или более из любых иллюстративных белков VEGF, описанных в данном документе, например, один или более из зрелого VEGF-A человека, зрелого VEGF-B человека, зрелого VEGF-C человека и зрелого VEGF-D человека) от связывания с одним или более его рецепторами (например, одним или более рецепторами VEGF) см., например, WO 1998/045331, US 9 079 953, US 2015/0147317, US 2016/0289314, Plotkin et al., *Otology & Neurotology* 33: 1046-1052 (2012); и Ferrara et al. (2005) *Biochem Biophys Res Commun* 333(2): 328-335, каждая из которых полностью включена в настоящий документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления антитело может снижать последующую передачу сигналов (например, передачу сигнала далее от рецептора VEGF, например, одного или более из любых иллюстративных рецепторов VEGF, описанных в данном документе, например, одного или более из VEGFR-1 человека, VEGFR-2 человека и VEGFR-3 человека). В определенных вариантах осуществления снижение активности VEGF может быть обнаружено опосредованно,

например, с помощью размера опухоли ВШ и/или изменения симптомов, ассоциированных с ВШ, описанных в данном документе, например, посредством повышения слуха (например, повышения слуха от 1% до около 400% (или любого из поддиапазонов этого диапазона, описанного в данном документе)) или снижения (например, от 1% до 99%, от 1% до 95%, от 1% до 90%, от 1% до 85%, от 1% до 80%, от 1% до 75%, от 1% до 70%, от 1% до 65%, от 1% до 60%, от 1% до 55%, от 1% до 50%, от 1% до 45%, от 1% до 40%, от 1% до 35%, от 1% до 30%, от 1% до 25%, от 1% до 20%, от 1% до 15%, от 1% до 10%, от 1% до 5%, от 5% до 99%, от 5% до 95%, от 5% до 90%, от 5% до 85%, от 5% до 80%, от 5% до 75%, от 5% до 70%, от 5% до 65%, от 5% до 60%, от 5% до 55%, от 5% до 50%, от 5% до 45%, от 5% до 40%, от 5% до 35%, от 5% до 30%, от 5% до 25%, от 5% до 20%, от 5% до 15%, от 5% до 10%, от 10% до 99%, от 10% до 95%, от 10% до 90%, от 10% до 85%, от 10% до 80%, от 10% до 75%, от 10% до 70%, от 10% до 65%, от 10% до 60%, от 10% до 55%, от 10% до 50%, от 10% до 45%, от 10% до 40%, от 10% до 35%, от 10% до 30%, от 10% до 25%, от 10% до 20%, от 10% до 15%, от 15% до 99%, от 15% до 95%, от 15% до 90%, от 15% до 85%, от 15% до 80%, от 15% до 75%, от 15% до 70%, от 15% до 65%, от 15% до 60%, от 15% до 55%, от 15% до 50%, от 15% до 45%, от 15% до 40%, от 15% до 35%, от 15% до 30%, от 15% до 25%, от 15% до 20%, от 20% до 99%, от 20% до 95%, от 20% до 90%, от 20% до 85%, от 20% до 80%, от 20% до 75%, от 20% до 70%, от 20% до 65%, от 20% до 60%, от 20% до 55%, от 20% до 50%, от 20% до 45%, от 20% до 40%, от 20% до 35%, от 20% до 30%, от 20% до 25%, от 25% до 99%, от 25% до 95%, от 25% до 90%, от 25% до 85%, от 25% до 80%, от 25% до 75%, от 25% до 70%, от 25% до 65%, от 25% до 60%, от 25% до 55%, от 25% до 50%, от 25% до 45%, от 25% до 40%, от 25% до 35%, от 25% до 30%, от 30% до 99%, от 30% до 95%, от 30% до 90%, от 30% до 85%, от 30% до 80%, от 30% до 75%, от 30% до 70%, от 30% до 65%, от 30% до 60%, от 30% до 55%, от 30% до 50%, от 30% до 45%, от 30% до 40%, от 30% до 35%, от 35% до 99%, от 35% до 95%, от 35% до 90%, от 35% до 85%, от 35% до 80%, от 35% до 75%, от 35% до 70%, от 35% до 65%, от 35% до 60%, от 35% до 55%, от 35% до 50%, от 35% до 45%, от 35% до 40%, от 40% до 99%, от 40% до 95%, от 40% до 90%, от 40% до 85%, от 40% до 80%, от 40% до 75%, от 40% до 70%, от 40% до 65%, от 40% до 60%, от 40% до 55%, от 40% до 50%, от 40% до 45%, от 45% до 99%, от 45% до 95%, от 45% до 90%, от 45% до 85%, от 45% до 80%, от 45% до 75%, от 45% до 70%, от 45% до 65%, от 45% до 60%, от 45% до 55%, от 45% до 50%, от 50% до 99%, от 50% до 95%, от 50% до 90%, от 50% до 85%, от 50% до 80%, от 50% до 75%, от 50% до 70%, от 50% до 65%, от 50% до 60%, от 50% до 55%, от 55% до 99%, от 55% до 95%, от 55% до 90%, от 55% до 85%, от 55% до 80%, от 55% до 75%, от 55% до 70%, от 55% до 65%, от 55% до 60%, от 60% до 99%, от 60% до 95%, от 60%

до 90%, от 60% до 85%, от 60% до 80%, от 60% до 75%, от 60% до 70%, от 60% до 65%, от 65% до 99%, от 65% до 95%, от 65% до 90%, от 65% до 85%, от 65% до 80%, от 65% до 75%, от 65% до 70%, от 70% до 99%, от 70% до 95%, от 70% до 90%, от 70% до 85%, от 70% до 80%, от 70% до 75%, от 75% до 99%, от 75% до 95%, от 75% до 90%, от 75% до 85%, от 75% до 80%, от 80% до 99%, от 80% до 95%, от 80% до 90%, от 80% до 85%, от 85% до 99%, от 85% до 95%, от 85% до 90%, от 90% до 99%, от 90% до 95% или от 95% до 99%) размера опухоли ВШ и/или степени тяжести одного или более симптомов акустической невромы, ВШ или нейрофиброматоза II типа у млекопитающего по сравнению со степенью тяжести одного или более симптомов акустической невромы (например, потери слуха, шума в ушах, вертиго, снижения качества жизни и т.д.) и/или размера акустической невромы, ВШ или нейрофиброматоза II типа у млекопитающего, соответственно, до введения любых частиц гAAV, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления снижение активности VEGF можно обнаружить в анализе *in vitro*.

[0253] В некоторых вариантах осуществления антитело может представлять собой гуманизированное антитело, химерное антитело или поливалентное антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело может представлять собой scFv-Fc, домен VHH, домен VNAR, (scFv)₂, минитело или BiTE. В некоторых вариантах осуществления антитело может представлять собой DVD-Ig и переориентирующееся антитело с двойной аффинностью (DART), триомаб, kih IgG с общей LC, crossmab, орто-Fab IgG, IgG 2-в-1, IgG-ScFv, scFv2-Fc, би-нанотело, тандемное антитело, DART-Fc, scFv-HAS-scFv, DNL-Fab3, DAF (два в одном или четыре в одном), DutaMab, DT-IgG, «выступы-во-впадины» с общей LC, сборку «выступы-во-впадины», антитело с зарядовой парой, антитело с обменом Fab-плеча, SEEDbody, Triomab, LUZ-Y, Fcab, κλ-тело, ортогональный Fab, DVD-IgG, IgG(H)-scFv, scFv-(H)IgG, IgG(L)-scFv, scFv-(L)-IgG, IgG (L,H)-Fc, IgG(H)-V, V(H)-IgG, IgG(L)-V, V(L)-IgG, kih IgG-scFab, 2scFv-IgG, IgG-2scFv, scFv4-Ig, Zybody, DVI-IgG, нанотело, нанотело-HSA, диатело, TandAb, scDiabody, scDiabody-CH3, Diabody-CH3, тройное тело, миниантитело, минитело, минитело TriBi, scFv-CH3 kih, Fab-scFv, scFv-CH-CL-scFv, F(ab')₂-scFv2, scFv-kih, Fab-scFv-Fc, четырехвалентный HCAb, scDiabody-Fc, диатело-Fc, тандемный scFv-Fc, интратело, биспецифическое антитело на основе технологии «dock and lock», ImmTAC, HSAbody, scDiabody-HAS, тандемный scFv, IgG-IgG, Cov-X-Body и scFv1-PEG-scFv2.

[0254] Дополнительные примеры антител включают фрагмент Fv, фрагмент Fab, фрагмент F(ab')₂ и фрагмент Fab'. Дополнительные примеры антител включают антигенсвязывающий фрагмент IgG (например, антигенсвязывающий фрагмент IgG1, IgG2,

IgG3 или IgG4) (например, антигенсвязывающий фрагмент человеческого или гуманизированного IgG, например, человеческий или гуманизированный IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4); антигенсвязывающий фрагмент IgA (например, антигенсвязывающий фрагмент IgA1 или IgA2) (например, антигенсвязывающий фрагмент человеческого или гуманизированного IgA, например, человеческий или гуманизированный IgA1 или IgA2); антигенсвязывающий фрагмент IgD (например, антигенсвязывающий фрагмент человеческого или гуманизированного IgD); антигенсвязывающий фрагмент IgE (например, антигенсвязывающий фрагмент человеческого или гуманизированного IgE); или антигенсвязывающий фрагмент IgM (например, антигенсвязывающий фрагмент человеческого или гуманизированного IgM).

[0255] В некоторых вариантах осуществления любое из описанных в данном документе антител может специфически связываться с VEGF. В некоторых вариантах осуществления любое из описанных в данном документе антител может специфически связываться с PDGF/VEGF.

[0256] Домен VHH представляет собой одиночный мономерный переменный домен антитела, который встречается у верблюдовых. Домен VNAR представляет собой одиночный мономерный переменный домен антитела, который можно обнаружить у хрящевых рыб. Неограничивающие аспекты доменов VHH и VNAR описаны, например, в Cromie et al., *Curr. Top. Med. Chem.* 15:2543-2557, 2016; De Genst et al., *Dev. Comp. Immunol.* 30:187-198, 2006; De Meyer et al., *Trends Biotechnol.* 32:263-270, 2014; Kijanka et al., *Nanomedicine* 10:161-174, 2015; Kovaleva et al., *Expert. Opin. Biol. Ther.* 14:1527-1539, 2014; Krah et al., *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 38:21-28, 2016; Mujic-Delic et al., *Trends Pharmacol. Sci.* 35:247-255, 2014; Muyldermans, *J. Biotechnol.* 74:277-302, 2001; Muyldermans et al., *Trends Biochem. Sci.* 26:230-235, 2001; Muyldermans, *Ann. Rev. Biochem.* 82:775-797, 2013; Rahbarizadeh et al., *Immunol. Invest.* 40:299-338, 2011; Van Audenhove et al., *EBioMedicine* 8:40-48, 2016; Van Bockstaele et al., *Curr. Opin. Investig. Drugs* 10:1212-1224, 2009; Vincke et al., *Methods Mol. Biol.* 911:15-26, 2012; и Wesolowski et al., *Med. Microbiol. Immunol.* 198:157-174, 2009, полное содержание каждой из которых включено в данный документ посредством ссылки.

[0257] В некоторых вариантах осуществления фрагменты «Fv» содержат нековалентно связанный димер одного переменного домена тяжелой цепи и одного переменного домена легкой цепи.

[0258] В некоторых вариантах осуществления фрагмент «Fab» содержит константный

домен легкой цепи и первый константный домен (CH1) тяжелой цепи, в дополнение к переменным доменам тяжелой и легкой цепи фрагмента Fv.

[0259] В некоторых вариантах осуществления фрагмент «F(ab')₂» содержит два фрагмента Fab, соединенных вблизи шарнирной области дисульфидными связями.

[0260] В некоторых вариантах осуществления «иммуноглобулин с двойным переменным доменом» или «DVD-Ig» относится к поливалентным и мультиспецифическим связывающим белкам, как описано, например, в публикациях DiGiammarino et al., *Methods Mol. Biol.* 899:145-156, 2012; Jakob et al., *MABs* 5:358-363, 2013; и патентах США 7 612 181; 8 258 268; 8 586 714; 8 716 450; 8 722 855; 8 735 546; и 8 822 645, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки.

[0261] В некоторых вариантах осуществления анализы стабильности мишени, реагирующей на аффинность лекарственного средства (DARTS), описаны и проводятся, как указано, например, в публикации Garber, *Nature Reviews Drug Discovery* 13:799-801, 2014; которая полностью включена в данный документ посредством ссылки.

[0262] В некоторых вариантах осуществления любое из описанных в данном документе антител имеет константу диссоциации (KD) менее 1×10^{-5} М (например, менее $0,5 \times 10^{-5}$ М, менее 1×10^{-6} М, менее $0,5 \times 10^{-6}$ М, менее 1×10^{-7} М, менее $0,5 \times 10^{-7}$ М, менее 1×10^{-8} М, менее $0,5 \times 10^{-8}$ М, менее 1×10^{-9} М, менее $0,5 \times 10^{-9}$ М, менее 1×10^{-10} М, менее $0,5 \times 10^{-10}$ М, менее 1×10^{-11} М, менее $0,5 \times 10^{-11}$ М или менее 1×10^{-12} М), например, как измерено в фосфатно-солевом буферном растворе с помощью поверхностного плазмонного резонанса (ППР) для белка VEGF (например, любого из белков VEGF, описанных в данном документе, например, одного или более из зрелого VEGF-A человека, зрелого VEGF-B человека, зрелого VEGF-C человека и зрелого VEGF-D человека).

[0263] В некоторых вариантах осуществления любое из описанных в данном документе антител имеет KD от около 1×10^{-12} М до около 1×10^{-5} М, около $0,5 \times 10^{-5}$ М, около 1×10^{-6} М, около $0,5 \times 10^{-6}$ М, около 1×10^{-7} М, около $0,5 \times 10^{-7}$ М, около 1×10^{-8} М, около $0,5 \times 10^{-8}$ М, около 1×10^{-9} М, около $0,5 \times 10^{-9}$ М, около 1×10^{-10} М, около $0,5 \times 10^{-10}$ М, около 1×10^{-11} М или около $0,5 \times 10^{-11}$ М (включительно); от около $0,5 \times 10^{-11}$ М до около 1×10^{-5} М, около $0,5 \times 10^{-5}$ М, около 1×10^{-6} М, около $0,5 \times 10^{-6}$ М, около 1×10^{-7} М, около $0,5 \times 10^{-7}$ М, около 1×10^{-8} М, около $0,5 \times 10^{-8}$ М, около 1×10^{-9} М, около $0,5 \times 10^{-9}$ М, около 1×10^{-10} М, около $0,5 \times 10^{-10}$ М или около 1×10^{-11} М (включительно); от около 1×10^{-11} М до около 1×10^{-5} М, около $0,5 \times 10^{-5}$ М, около 1×10^{-6} М, около $0,5 \times 10^{-6}$ М, около 1×10^{-7} М, около $0,5 \times 10^{-7}$ М, около 1×10^{-8} М, около $0,5 \times 10^{-8}$ М, около 1×10^{-9} М, около

0,5 x 10⁻⁹ М, около 1 x 10⁻¹⁰ М или около 0,5 x 10⁻¹⁰ М (включительно); от около 0,5 x 10⁻¹⁰ М до около 1 x 10⁻⁵ М, около 0,5 x 10⁻⁵ М, около 1 x 10⁻⁶ М, около 0,5 x 10⁻⁶ М, около 1 x 10⁻⁷ М, около 0,5 x 10⁻⁷ М, около 1 x 10⁻⁸ М, около 0,5 x 10⁻⁸ М, около 1 x 10⁻⁹ М, около 0,5 x 10⁻⁹ М или около 1 x 10⁻¹⁰ М (включительно); от около 1 x 10⁻¹⁰ М до около 1 x 10⁻⁵ М, около 0,5 x 10⁻⁵ М, около 1 x 10⁻⁶ М, около 0,5 x 10⁻⁶ М, около 1 x 10⁻⁷ М, около 0,5 x 10⁻⁷ М, около 1 x 10⁻⁸ М, около 0,5 x 10⁻⁸ М, около 1 x 10⁻⁹ М или около 0,5 x 10⁻⁹ М (включительно); от около 0,5 x 10⁻⁹ М до около 1 x 10⁻⁵ М, около 0,5 x 10⁻⁵ М, около 1 x 10⁻⁶ М, около 0,5 x 10⁻⁶ М, около 1 x 10⁻⁷ М, около 0,5 x 10⁻⁷ М, около 1 x 10⁻⁸ М, около 0,5 x 10⁻⁸ М или около 1 x 10⁻⁹ М (включительно); от около 1 x 10⁻⁹ М до около 1 x 10⁻⁵ М, около 0,5 x 10⁻⁵ М, около 1 x 10⁻⁶ М, около 0,5 x 10⁻⁶ М, около 1 x 10⁻⁷ М, около 0,5 x 10⁻⁷ М, около 1 x 10⁻⁸ М или около 0,5 x 10⁻⁸ М (включительно); от около 0,5 x 10⁻⁸ М до около 1 x 10⁻⁵ М, около 0,5 x 10⁻⁵ М, около 1 x 10⁻⁶ М, около 0,5 x 10⁻⁶ М, около 1 x 10⁻⁷ М, около 0,5 x 10⁻⁷ М или около 1 x 10⁻⁸ М (включительно); от около 1 x 10⁻⁸ М до около 1 x 10⁻⁵ М, около 0,5 x 10⁻⁵ М, около 1 x 10⁻⁶ М, около 0,5 x 10⁻⁶ М, около 1 x 10⁻⁷ М или около 0,5 x 10⁻⁷ М (включительно); от около 0,5 x 10⁻⁷ М до около 1 x 10⁻⁵ М, около 0,5 x 10⁻⁵ М, около 1 x 10⁻⁶ М, около 0,5 x 10⁻⁶ М, или около 1 x 10⁻⁷ М (включительно); от около 1 x 10⁻⁷ М до около 1 x 10⁻⁵ М, около 0,5 x 10⁻⁵ М, около 1 x 10⁻⁶ М или около 0,5 x 10⁻⁶ М (включительно); от около 0,5 x 10⁻⁶ М до около 1 x 10⁻⁵ М, около 0,5 x 10⁻⁵ М или около 1 x 10⁻⁶ М (включительно); от около 1 x 10⁻⁶ М до около 1 x 10⁻⁵ М или около 0,5 x 10⁻⁵ М (включительно); или от около 0,5 x 10⁻⁵ М до около 1 x 10⁻⁵ М (включительно), например, как измерено в фосфатно-солевом буферном растворе с помощью поверхностного плазмонного резонанса (ППР) для белка VEGF (например, любого из белков VEGF, описанных в данном документе, например, одного или более из зрелого VEGF-A человека, зрелого VEGF-B человека, зрелого VEGF-C человека и зрелого VEGF-D человека).

[0264] Для определения значений KD любого из описанных в данном документе антител можно использовать множество различных способов, известных в данной области (например, анализ сдвига электрофоретической подвижности, анализ связывания на фильтрах, поверхностный плазмонный резонанс, анализ кинетики бимолекулярного связывания и т.д.).

[0265] В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в данном документе антител период полужизни антитела в организме субъекта (например, человека) снижается в от около 0,5 раза до около 4 раз (например, от около 0,5 раза до около 3,5 раза, от около 0,5 раза до около 3 раз, от около 0,5 раза до около 2,5 раза, от около 0,5 раза до около 2 раз, от около 0,5 раза до около 1,5 раза, от около 0,5 раза до около 1 раза, от около

1 раза до около 4 раз, от около 1 раза до около 3,5 раза, от около 1 раза до около 3 раз, от около 1 раза до около 2,5 раза, от около 1 раза до около 2 раз, от около 1,5 раза до около 4 раз, от около 1,5 раза до около 3,5 раза, от около 1,5 раза до около 3 раз, от около 1,5 раза до около 2,5 раза, от около 1,5 раза до около 2 раз, от около 2 раз до около 4 раз, от около 2 раз до около 3,5 раза, от около 2 раз до около 3 раз, от около 2 раз до около 2,5 раза, от около 2,5 раза до около 4 раз, от около 2,5 раза до около 3,5 раза, от около 2,5 раза до около 3 раз, от около 3 раз до около 4 раз, от около 3 раз до около 3,5 раза или от около 3,5 раза до около 4 раз) по сравнению с периодом полужизни контрольного антитела (например, любого из контрольных антител или условий, описанных в данном документе) у аналогичного субъекта. См., например, Leabman et al., MAbs. 5(6): 896-903, 2013, полностью включена в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления антитело, описанное в данном документе, имеет одну или более аминокислотных замен в области Fc, которые уменьшают время его полужизни у млекопитающего, а в контрольном антителе отсутствует по меньшей мере одна (например, отсутствуют все) из этих одной или более аминокислотных замен в области Fc.

[0266] В некоторых вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с VEGF, представляет собой бевацизумаб (Авастатин®). Бевацизумаб (полноразмерное антитело ~150 кДа) ингибирует все изоформы VEGF-A. Бевацизумаб получил одобрение Управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) в 2004 г. для лечения рака толстой кишки для внутривенного (в/в) введения в дозе 4,0–7,5 мг/кг в течение 2–3 недель (период полувыведения из плазмы 21 день), для интравитреального введения (ивт) в дозе 1,25 мг в 0,05 мл (период полувыведения 5,6 дня). Бевацизумаб имеет K_D в отношении VEGF 165 (VEGF-A) 58 пМ. См., например, WO 2017/050825; которая полностью включена в данный документ посредством ссылки.

[0267] В некоторых вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с VEGF, представляет собой ранибизумаб (Луцентис®). Ранибизумаб (~50 кДа) ингибирует все изоформы VEGF-A. Ранибизумаб получил одобрение FDA в 2006 г. для глазного применения для внутривенного (в/в) введения в дозе 4,0–7,5 мг/кг в течение 2–3 недель (период полувыведения из плазмы 0,5 дня), для интравитреального (ивт) введения в дозе 0,5 мг в 0,05 мл (период полувыведения 3,2 дня). Ранибизумаб имеет K_D в отношении VEGF-A₁₆₅ (изоформа 165 VEGF-A, представленная SEQ ID NO: 6) 46 пМ. См., например, WO 2014/178078; которая полностью включена в данный документ посредством ссылки.

[0268] В некоторых вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с VEGF, представляет собой севацизумаб (APX003/SIM-BD0801) или его характерную часть.

[0269] В определенных вариантах осуществления последовательность, кодирующая анти-VEGF белок, содержащаяся в композиции, как описано в данном документе (например, rAAV-анти-VEGF), выбрана из ингибиторов VEGF, одобренных для лечения патологической васкуляризации сетчатки, а также при глиобластоме и других видах рака, включая, например: бевацизумаб (Авастин®); афлиберцепт (Эйлеа®); зив-афлиберцепт (Залтрап®); бролуцизумаб (Беову®); и/или ранибизумаб (Луцентис®). Кроме того, в некоторых вариантах осуществления можно использовать биоаналоги многих из этих продуктов на различных стадиях доклинической и клинической разработки, а также биоаналог ранибизумаба, Разумаб®.

[0270] Ранибизумаб, афлиберцепт и бролуцизумаб одобрены для повторного интравитреального введения при влажной форме возрастной макулярной дегенерации (ВМД); ранибизумаб и афлиберцепт дополнительно одобрены для повторного интравитреального введения при окклюзии вен сетчатки (ОВС), диабетическом макулярном отеке (ДМО) и диабетической ретинопатии (ДР). Было обнаружено, что целенаправленная местная доставка и ассоциированное с ней снижение системного воздействия может привести к улучшению профилей безопасности (включая более низкие показатели тромбоземболических явлений) по сравнению с внутривенными схемами лечения ингибиторами VEGF. Варианты генной терапии этих терапевтических средств в настоящее время находятся на стадии клинической разработки по показаниям ВМД и ДМО (Clinicaltrials.gov 2020b, 2020c и 2020d [NCT03066258, NCT03748784 и NCT04418427], каждый из которых полностью включен в данный документ посредством ссылки). Афлиберцепт представляет собой рекомбинантный слитый белок (97 кДа), состоящий из частей внеклеточных доменов рецепторов VEGF 1 и 2 человека, слитых с Fc-частью IgG1 человека, который показал свою эффективность в клинических испытаниях влажной ВМД и ДМО при местном введении в глаз путем многократного интравитреального введения. Как и бевацизумаб, зив-афлиберцепт также одобрен для внутривенной инфузии и имеет аналогичные риски и предупреждения в отношении кровотечения и заживления ран (Sanofi-Aventis US 2020, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки).

[0271] В исследовании пациентов с влажной возрастной макулярной дегенерацией (ВМД) локальное введение клинических доз анти-VEGF белков, таких как бевацизумаб и ранибизумаб, вводимых путем интравитреальной инъекции, сопровождалось

значительным улучшением остроты зрения через 4 месяца; однако в этот же момент времени уровни VEGF в плазме были значительно снижены только в когорте, которой вводили бевацизумаб (Carneiro 2012, полностью включена в данный документ посредством ссылки). В определенных вариантах осуществления способы и композиции, описанные в данном изобретении, обеспечивают решение проблемы снижения уровня VEGF в плазме крови, ассоциированной с системной доставкой и/или потенциально ассоциированной с острой локализованной доставкой бевацизумаба. В некоторых исследованиях были продемонстрированы результаты, согласующиеся с результатами фармакокинетических исследований, например, у кроликов бевацизумаб, но не ранибизумаб, обнаруживается в сыворотке после интравитреальной инъекции (Bakri 2007, полностью включена в данный документ посредством ссылки). Обзор данных по клинической безопасности, полученных в опорных исследованиях ВМД, позволяет предположить, что многократное интравитреальное введение ранибизумаба в течение периода до двух лет не связано со значительными рисками для безопасности (Schmidt-Erfurth 2010, полностью включена в данный документ посредством ссылки).

Ранибизумаб

[0272] Ранибизумаб представляет собой фрагмент гуманизированного моноклонального антитела (Fab) с такой же клинической эффективностью и частотой тромбоэмболических осложнений, что и у афлиберцепта, при местном введении в глаз путем интравитреального введения (Genentech 2017, полностью включена в данный документ посредством ссылки). Это Fab IgG1, который связывается с VEGF и нейтрализует его. Считается, что ранибизумаб связывает и ингибирует биологическую активность всех известных изоформ белка VEGF-A человека, предотвращая их взаимодействие с родственными рецепторами (VEGFR-1 и VEGFR-2). Ранибизумаб продается под торговой маркой Луцентис®. Он одобрен FDA для лечения макулярного отека после окклюзии вен сетчатки, возрастной макулярной дегенерации (влажной) и диабетического макулярного отека. По сравнению с бевацизумабом, ранибизумаб демонстрирует более чем в 8 раз более высокую связывающую способность и в 66 раз более высокую аффинность связывания (Klettner 2008; Yang 2014, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки). Эти различия дают IC50 для VEGF-индуцированной эндотелиальной пролиферации для ранибизумаба, которая в 6 раз меньше, чем для бевацизумаба, при этом ранибизумаб оказывает клинически значимое влияние на активность VEGF до 0,37 наномолей (нМ) (~17 нанограммов на миллилитр [нг/мл] ранибизумаба; Yang 2014, полностью включена в данный документ посредством ссылки). Важно отметить, что

ранибизумаб также не имеет Fc-области, что позволяет молекуле избежать повторной переработки Fc и делает ее значительно меньше (48 кДа), чем полноразмерное антитело (149 кДа) (Meuer 2011, полностью включена в данный документ посредством ссылки). В некоторых вариантах осуществления этот меньший размер молекулы может быть полезен для улучшения диффузии к целевой зоне, способности экстравазации в интерстиций опухоли и/или эффективности диффузии в целевые зоны внутри опухоли (Xenaki 2017, полностью включена в данный документ посредством ссылки). В некоторых вариантах осуществления композиции, как описано в данном документе, содержат кодирующую последовательность ранибизумаба для разработки продукта для генной терапии на основе гAAV. В некоторых вариантах осуществления композиции, как описано в данном документе (например, гAAV-анти-VEGF), могут быть доставлены в улитку, при этом внутриволеарное введение может привести к низкому системному воздействию и, таким образом, к улучшенному профилю безопасности по сравнению с внутривенным введением.

[0273] В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к композициям, содержащим ранибизумаб, анти-VEGF белок, в котором отсутствует область Fc. Считается, что область Fc антитела, как в бевацизумабе, позволяет бевацизумабу распространяться через биологические барьеры посредством переноса, опосредованного Fc-рецептором, а также активировать иммунный ответ (Kim 2009; Meuer 2011, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки). Некоторые исследования показали, что по сравнению с бевацизумабом, ранибизумаб может проявлять в 17 раз большую связывающую способность и в 6 раз большую аффинность связывания при высоком разведении (Ferrara 2006; Klettner 2008, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки), что предполагает большую специфическую активность при более низких концентрациях. В некоторых вариантах осуществления меньший молекулярный размер ранибизумаба (48 кДа по сравнению с 149 кДа для бевацизумаба) также может быть полезен для улучшения диффузии к целевой зоне, способности экстравазации в интерстиций опухоли и/или эффективности диффузии в целевые зоны внутри опухоли (Xenaki 2017, полностью включена в данный документ посредством ссылки).

[0274] В некоторых вариантах осуществления описанный в данном документе анти-VEGF белок, который специфически связывается с VEGF и/или его антигенпрезентирующими фрагментами, представляет собой антитело. В некоторых вариантах осуществления такое антитело содержит переменный домен легкой цепи иммуноглобулина, который представляет собой или включает последовательность, которая

по меньшей мере на 80% идентична (например, по меньшей мере на 82%, по меньшей мере на 84%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99%) идентична вариабельному домену легкой цепи иммуноглобулина ранибизумаба, и/или содержит вариабельный домен тяжелой цепи иммуноглобулина, который представляет собой или включает последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична (например, по меньшей мере на 82%, по меньшей мере на 84%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99%) идентична вариабельному домену тяжелой цепи иммуноглобулина ранибизумаба.

[0275] В некоторых вариантах осуществления описанный в данном документе анти-VEGF белок, который специфически связывается с VEGF и/или его антигенпрезентирующими фрагментами, представляет собой антитело. В некоторых вариантах осуществления такое антитело содержит, *среди прочего*, вариабельный домен легкой цепи иммуноглобулина, который представляет собой или включает вариабельный домен легкой цепи иммуноглобулина ранибизумаба, и/или вариабельный домен тяжелой цепи иммуноглобулина, который представляет собой или включает вариабельный домен тяжелой цепи иммуноглобулина ранибизумаба. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит вариабельный домен легкой цепи иммуноглобулина, который представляет собой или включает последовательность вариабельного домена легкой цепи иммуноглобулина ранибизумаба (как представлено SEQ ID NO: 20), за исключением того, что оно содержит один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать или пятнадцать аминокислотных замен, и/или содержит вариабельный домен тяжелой цепи иммуноглобулина, который представляет собой или включает последовательность вариабельного домена легкой цепи иммуноглобулина ранибизумаба (как представлено SEQ ID NO: 16, 17 или 18), за исключением того, что он содержит один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать или пятнадцать аминокислотных замен. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен содержит три CDR в вариабельном домене легкой цепи иммуноглобулина ранибизумаба и/или три CDR в вариабельном домене тяжелой цепи иммуноглобулина ранибизумаба.

[0276] Иллюстративная нуклеотидная последовательность тяжелой цепи

ранибизумаба (SEQ ID NO: 13)

GAGGTGCAGCTGGTGGAAATCTGGCGGCGGACTTGTTCAACCTGGCGGCTCTCTGAG
ACTGAGCTGTGCCGCTTCTGGCTACGACTTCACCCACTACGGCATGAACTGGGTCCG
ACAGGCCCTGGCAAAGGCCTTGAATGGGTCCGATGGATCAACACCTACACCGGCG
AGCCAACATACGCCGCCGACTTCAAGCGGAGATTACCTTCAGCCTGGACACCAGC
AAGAGCACCGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTA
CTACTGCGCCAAGTATCCCTACTACTACGGCACCAGCCACTGGTACTTTGACGTGTG
GGGACAGGGCACACTGGTCACAGTGTCTAGCGCCTCTACAAAGGGCCCCAGCGTTT
TCCCCTGGCTCCTAGCAGCAAGTCTACCAGCGGAGGAACAGCCGCTCTGGGCTGTC
TGGTCAAGGACTACTTTCCCGAGCCTGTGACCGTGTCTGGAATTCTGGCGCTCTGA
CAAGCGGCGTGCACACCTTTCCAGCTGTGCTGCAAAGCAGCGGCCTGTACTCTCTGA
GCAGCGTCGTGACAGTGCCAAGCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAAT
GTGAACCACAAGCCTAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGAGCT
GCGACAAGACCCACACCGGCAAG

[0277] Иллюстративная нуклеотидная последовательность тяжелой цепи ранибизумаба (SEQ ID NO: 14)

GAGGTGCAGCTGGTGGAAATCTGGCGGCGGACTTGTTCAACCTGGCGGCTCTCTGAG
ACTGAGCTGTGCCGCTTCTGGCTACGACTTCACCCACTACGGCATGAACTGGGTCCG
ACAGGCCCTGGCAAAGGCCTTGAATGGGTCCGATGGATCAACACCTACACCGGCG
AGCCAACATACGCCGCCGACTTCAAGCGGAGATTACCTTCAGCCTGGACACCAGC
AAGAGCACCGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTA
CTACTGCGCCAAGTATCCCTACTACTACGGCACCAGCCACTGGTACTTTGACGTGTG
GGGACAGGGCACACTGGTCACAGTGTCTAGCGCCTCTACAAAGGGCCCCAGCGTTT
TCCCCTGGCTCCTAGCAGCAAGTCTACCAGCGGAGGAACAGCCGCTCTGGGCTGTC
TGGTCAAGGACTACTTTCCCGAGCCTGTGACCGTGTCTGGAATTCTGGCGCTCTGA
CAAGCGGCGTGCACACCTTTCCAGCTGTGCTGCAAAGCAGCGGCCTGTACTCTCTGA
GCAGCGTCGTGACAGTGCCAAGCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAAT
GTGAACCACAAGCCTAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGAGCT
GCGACAAGACCCACAAG

[0278] Иллюстративная нуклеотидная последовательность тяжелой цепи ранибизумаба (SEQ ID NO: 15)

GAGGTGCAGCTGGTGGAAATCTGGCGGCGGACTTGTTCAACCTGGCGGCTCTCTGAG
ACTGAGCTGTGCCGCTTCTGGCTACGACTTCACCCACTACGGCATGAACTGGGTCCG

ACAGGCCCTGGCAAAGGCCTTGAATGGGTCGGATGGATCAACACCTACACCGGCG
AGCCAACATACGCCGCCGACTTCAAGCGGAGATTCACCTTCAGCCTGGACACCAGC
AAGAGCACCGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTA
CTACTGCGCCAAGTATCCCTACTACTACGGCACCAGCCACTGGTACTTTGACGTGTG
GGGACAGGGCACACTGGTCACAGTGTCTAGCGCCTCTACAAAGGGCCCCAGCGTTT
TCCCCTGGCTCCTAGCAGCAAGTCTACCAGCGGAGGAACAGCCGCTCTGGGCTGTC
TGGTCAAGGACTACTTTCCCGAGCCTGTGACCGTGTCTGGAATTCTGGCGCTCTGA
CAAGCGGCGTGCACACCTTTCCAGCTGTGCTGCAAAGCAGCGGCCTGTACTCTCTGA
GCAGCGTCGTGACAGTGCCAAGCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAAT
GTGAACCACAAGCCTAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGAGC

[0279] Иллюстративная аминокислотная последовательность тяжелой цепи ранибизумаба (SEQ ID NO: 16)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINTYTGE
PTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPYYYGTSHWYFDVWG
QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSV
HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTG
K

[0280] Иллюстративная аминокислотная последовательность тяжелой цепи ранибизумаба (SEQ ID NO: 17)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINTYTGE
PTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPYYYGTSHWYFDVWG
QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSV
HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHL

[0281] Иллюстративная аминокислотная последовательность тяжелой цепи ранибизумаба (SEQ ID NO: 18)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINTYTGE
PTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPYYYGTSHWYFDVWG
QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSV
HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS

[0282] Иллюстративная нуклеотидная последовательность легкой цепи ранибизумаба (SEQ ID NO: 19)

GACATCCAGCTGACACAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCCTCTGTGGGAGACAGAGT

GACCATCACCTGTAGCGCCAGCCAGGACATCTCCAACTACCTGAACTGGTATCAGCA
AAAGCCCGGCAAGGCCCTAAGGTGCTGATCTACTTCACAAGCAGCCTGCACTCCG
GCGTGCCCAGCAGATTTTCTGGCTCTGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGACCATAT
CTAGCCTGCAGCCTGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTACAGCACCGTGC
CTTGACATTTGGCCAGGGCACAAAGGTGGAAATCAAGCGGACTGTGGCCGCTCCT
AGCGTGTTCATCTTTCCACCTAGCGACGAGCAGCTGAAGTCTGGCACAGCCTCTGTC
GTGTGCCTGCTGAACAATTCTACCCCAGAGAAGCCAAGGTGCAGTGGAAAGTGGA
CAATGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAAGAGAGCGTGACAGAGCAGGACTCCAAG
GATAGCACCTATAGCCTGAGCAGCACCTGACACTGAGCAAGGCCGACTACGAGAA
GCACAAAGTGTACGCCTGCGAAGTGACCCACCAGGGCCTTTCTAGCCCTGTGACCA
AGAGCTTCAACCGGGGCGAATGT

[0283] Иллюстративная аминокислотная последовательность легкой цепи ранибизумаба (SEQ ID NO: 20)

DIQLTQSPSSLASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIIYFTSSLHSGVPSR
FSGSGSGLDFLTISLQPEDFATYYCQYSTVPTWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD
EQLKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTTL
SKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0284] Иллюстративная нуклеотидная последовательность тяжелой и легкой цепи ранибизумаба, содержащего расщепляемый полипептид (SEQ ID NO: 103)

ATGTACCGGATGCAGCTGCTGAGCTGTATCGCCCTGTCTCTGGCCCTGGTCACCAAT
TCTGAGGTGCAGCTGGTGGAAATCTGGCGGCGGACTTGTTCAACCTGGCGGCTCTCTG
AGACTGAGCTGTGCCGCTTCTGGCTACGACTTCACCCACTACGGCATGAACTGGGTC
CGACAGGCCCTGGCAAAGGCCTTGAATGGGTCGGATGGATCAACACCTACACCGG
CGAGCCAACATACGCCGCCGACTTCAAGCGGAGATTCACCTTCAGCCTGGACACCA
GCAAGAGCACCGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTG
ТАCTACTGCGCCAAGTATCCCTACTACTACGGCACCCAGCCACTGGTACTTTGACGTG
TGGGGACAGGGCACACTGGTCACAGTGTCTAGCGCCTCTACAAAGGGCCCCAGCGT
TTTCCCCTGGCTCCTAGCAGCAAGTCTACCAGCGGAGGAACAGCCGCTCTGGGCTG
TCTGGTCAAGGACTACTTTCCCGAGCCTGTGACCGTGTCTGGAATTCTGGCGCTCT
GACAAGCGGCGTGCACACCTTTCCAGCTGTGCTGCAAAGCAGCGGCCTGTACTCTCT
GAGCAGCGTCGTGACAGTGCCAAGCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCA
ATGTGAACCACAAGCCTAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGAG
CTGCGACAAGACCCACACCGGCAAGCGGAAGAGAAGAGGCTCTGGCGAAGGCAGA

GGCAGCCTGCTTACATGTGGCGACGTGGAAGAGAACCCCGGACCTATGTATAGAAT
GCAGCTCCTGTCTGCATTGCCCTGAGCCTGGCTCTCGTGACCAACAGCGACATCCA
GCTGACACAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCCTCTGTGGGAGACAGAGTGACCATCA
CCTGTAGCGCCAGCCAGGACATCTCCAACCTACTGAACCTGGTATCAGCAAAAAGCCC
GGCAAGGCCCTAAGGTGCTGATCTACTTCACAAGCAGCCTGCACTCCGGCGTGCCC
AGCAGATTTTCTGGCTCTGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGACCATATCTAGCCTG
CAGCCTGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTACAGCACCGTGCCTTGGACA
TTTGGCCAGGGCACAAAGGTGGAAATCAAGCGGACTGTGGCCGCTCCTAGCGTGTT
CATCTTTCCACCTAGCGACGAGCAGCTGAAGTCTGGCACAGCCTCTGTCGTGTGCCT
GCTGAACAACCTTCTACCCCAGAGAAGCCAAGGTGCAGTGGAAAGTGGACAATGCCC
TGCAGAGCGGCAACAGCCAAGAGAGCGTGACAGAGCAGGACTCCAAGGATAGCAC
CTATAGCCTGAGCAGCACCCCTGACACTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAAG
TGTACGCCTGCGAAGTGACCCACCAGGGCCTTTCTAGCCCTGTGACCAAGAGCTTCA
ACCGGGGCGAATGT

[0285] Иллюстративная последовательность тяжелой и легкой цепи ранибизумаба, содержащего расщепляемый полипептид (SEQ ID NO: 21)

MYRMQLLSICIALSLALVTNSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWW
RQAPGKGLEWVGWINTYTGEPYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYY
CAKYPYYYGTSHWYFDVWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS
NTKVDKKVEPKSCDKTHTGKRKRRGSGEGRGSLTCTGDVEENPGPMYRMQLLSICIALS
LALVTNSDIQLTQSPSSLSASVGDRTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIIYFTSSL
HSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY
SLSSITLTLTKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Бевацизумаб

[0286] Бевацизумаб представляет собой гуманизированное моноклональное полноразмерное антитело к VEGF, одобренное для внутривенной инфузии при лечении глиобластомы, колоректального рака, рака легких, почки, шейки матки и яичников. Однако основными недостатками терапии бевацизумабом являются необходимость продолжения регулярного проведения внутривенных инфузий и побочные эффекты, связанные с высокими дозами в системном кровотоке, которые включают гипертензию, протеинурию, повышение активности печеночных ферментов, артериальные тромбоэмболические

явления (АТЕ), венозные тромбоэмболические явления, кровотечения, осложнения, связанные с хирургическим вмешательством, и осложнения при заживлении ран. В настоящее время бевацизумаб является единственным фармакологическим средством, для которого были продемонстрированы предварительные клинические доказательства эффективности у пациентов с ВШ.

[0287] В некоторых вариантах осуществления описанный в данном документе анти-VEGF белок, который специфически связывается с VEGF и/или его антигенпрезентирующими фрагментами, представляет собой антитело. В некоторых вариантах осуществления такое антитело содержит переменный домен легкой цепи иммуноглобулина, который представляет собой или включает последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична (например, по меньшей мере на 82%, по меньшей мере на 84%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99%) идентична переменному домену легкой цепи иммуноглобулина бевацизумаба, и/или содержит переменный домен тяжелой цепи иммуноглобулина, который представляет собой или включает последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична (например, по меньшей мере на 82%, по меньшей мере на 84%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99%) идентична переменному домену тяжелой цепи иммуноглобулина бевацизумаба.

[0288] В некоторых вариантах осуществления описанный в данном документе анти-VEGF белок, который специфически связывается с VEGF и/или его антигенпрезентирующими фрагментами, представляет собой антитело. В некоторых вариантах осуществления такое антитело содержит, среди прочего, переменный домен легкой цепи иммуноглобулина, который представляет собой или включает переменный домен легкой цепи иммуноглобулина бевацизумаба, и/или переменный домен тяжелой цепи иммуноглобулина, который представляет собой или включает переменный домен тяжелой цепи бевацизумаба. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит переменный домен легкой цепи иммуноглобулина, который представляет собой или включает последовательность переменного домена легкой цепи иммуноглобулина бевацизумаба, за исключением того, что оно содержит один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать или пятнадцать аминокислотных замен, и/или содержит переменный домен тяжелой цепи

иммуноглобулина, который представляет собой или включает последовательность переменного домена легкой цепи иммуноглобулина бевацизумаба, за исключением того, что он содержит один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать или пятнадцать аминокислотных замен.

[0289] В некоторых вариантах осуществления описанный в данном документе анти-VEGF белок, который специфически связывается с VEGF и/или его антигенпрезентирующими фрагментами, представляет собой антитело. В некоторых вариантах осуществления такое антитело содержит легкую цепь иммуноглобулина (например, содержащую переменный домен легкой цепи иммуноглобулина и константный домен легкой цепи иммуноглобулина), которая представляет собой или включает константный домен легкой цепи бевацизумаба, и/или тяжелую цепь иммуноглобулина (например, содержащий переменный домен тяжелой цепи иммуноглобулина и константный домен тяжелой цепи иммуноглобулина), который представляет собой или включает константный домен тяжелой цепи иммуноглобулина бевацизумаба. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит константный домен легкой цепи иммуноглобулина, который представляет собой или включает последовательность константного домена легкой цепи иммуноглобулина бевацизумаба, за исключением того, что он содержит один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать или пятнадцать аминокислотных замен и/или содержит константный домен тяжелой цепи иммуноглобулина, который является или включает последовательность константного домена тяжелой цепи иммуноглобулина бевацизумаба, за исключением того, что он содержит одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать или пятнадцать аминокислотных замен.

[0290] В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен содержит три CDR в переменном домене легкой цепи иммуноглобулина бевацизумаба и/или три CDR в переменном домене тяжелой цепи иммуноглобулина бевацизумаба. В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий домен содержит три CDR в переменном домене легкой цепи иммуноглобулина бевацизумаба и/или три CDR в переменном домене тяжелой цепи иммуноглобулина бевацизумаба.

[0291] Иллюстративная нуклеотидная последовательность бевацизумаба (SEQ ID NO: 22)

ATGTACCGGATGCAGCTGCTGAGCTGTATCGCCCTGTCTCTGGCCCTGGTCACCAAT
TCTGAGGTGCAGCTGGTGAATCTGGCGGCGGACTTGTTCAACCTGGCGGCTCTCTG
AGACTGAGCTGTGCCGCTTCTGGCTACACCTTCACCAACTACGGCATGAACTGGGTC
CGACAGGCCCTGGCAAAGGCCTTGAATGGGTTCGGATGGATCAACACCTACACCGG
CGAGCCAACATACGCCGCCGACTTCAAGCGGAGATTCACCTTCAGCCTGGACACCA
GCAAGAGCACCGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTG
TACTACTGCGCCAAGTATCCCCACTACTACGGCAGCAGCCACTGGTACTTTGACGTG
TGGGGACAGGGCACACTGGTCACAGTGTCTAGCGCCTCTACAAAGGGCCCCAGCGT
TTTCCCACTGGCTCCTAGCAGCAAGTCTACCAGCGGAGGAACAGCCGCTCTGGGCTG
TCTGGTCAAGGACTACTTTCCCGAGCCTGTGACCGTGTCTGGAATTCTGGCGCTCT
GACAAGCGGCGTGCACACCTTTCCAGCTGTGCTGCAAAGCAGCGGCCTGTACTCTCT
GAGCAGCGTCGTGACAGTGCCAAGCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCA
ATGTGAACCACAAGCCTAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGAG
CTGCGACAAGACCCACACCTGTCCTCCATGTCCTGCTCCAGAAGTCTCGGCGGACC
TTCCGTGTTCTGTTTCCCTCCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCC
TGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCACGAGGATCCCGAAGTGAAGTTCA
ATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGA
ACAGTACAACAGCACCTACAGAGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTCTGCACCAGGATT
GGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGC AAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCTCCT
ATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACCCCAGGTTTACAC
ACTGCCTCCAAGCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTCG
TGAAGGGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAATGGCCAGCCA
GAGAACA ACTACAAGACAACCCCTCCTGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTTCCTG
TACAGCAAGCTGACAGTGGACAAGTCCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTTCTGCTG
CAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCTCTGAGCCTGT
CTCCTGGCAAGCGGAAGAGAAGAGGCTCTGGCGAAGGCAGAGGCAGCCTGCTTACA
TGTGGCGACGTGGAAGAGAACCCCGGACCTATGTATAGAATGCAGCTCCTGTCTG
CATTGCCCTGAGCCTGGCTCTCGTGACCAACAGCGACATCCAGATGACACAGAGCC
CCAGCAGCCTGTCTGCCTCTGTGGGAGACAGAGTGACCATCACCTGTAGCGCCAGCC
AGGACATCTCCA ACTACCTGAACTGGTATCAGCAAAAGCCCGGCAAGGCCCTAAG
GTGCTGATCTACTTACAAGCAGCCTGCACTCCGGCGTGCCAGCAGATTTTCTGGC
TCTGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGACCATATCTAGCCTGCAGCCTGAGGACTTC
GCCACCTACTACTGCCAGCAGTACAGCACCGTGCCTTGGACATTTGGCCAGGGCACA
AAGGTGGAAATCAAGCGGACTGTGGCCGCTCCTAGCGTGTTTCATCTTTCCACCTAGC

GACGAGCAGCTGAAGTCTGGCACAGCCTCTGTCGTGTGCCTGCTGAACAACCTTCTAC
CCCAGAGAAGCCAAGGTGCAGTGGAAAGTGGACAATGCCCTGCAGAGCGGCAACA
GCCAAGAGAGCGTGACAGAGCAGGACTCCAAGGATAGCACCTATAGCCTGAGCAGC
ACCCTGACACTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAAGTGTACGCCTGCGAAGT
GACCCACCAGGGCCTTTCTAGCCCTGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAATGT

[0292] Иллюстративная аминокислотная последовательность тяжелой и легкой цепи бевацизумаба, содержащего расщепляемый полипептид (SEQ ID NO: 23).

MYRMQLLSICIALSLALVTNSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVR
QAPGKGLEWVGWINTYTGEPYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYC
AKYPHYYGSSHWYFDVWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD
YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN
TKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVVVDVSH
EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVVS
NKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTTPVLDSGSSFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVHEALHNHYTQKSLS
LSPGKRKRKRRGSGEGRGSLTCGDVEENPGPMYRMQLLSICIALSLALVTNSDIQMTQSPSS
LSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQKPKGKAPKVLIIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTD
FTLTISSLQPEDFATYYCQYSTVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS
VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLKADYEKH
KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0293] Иллюстративная нуклеотидная последовательность тяжелой цепи бевацизумаба (SEQ ID NO: 108)

ATGTACCGGATGCAGCTGCTGAGCTGTATCGCCCTGTCTCTGGCCCTGGTCACCAAT
TCTGAGGTGCAGCTGGTGGAAATCTGGCGGCGGACTTGTTCAACCTGGCGGCTCTCTG
AGACTGAGCTGTGCCGCTTCTGGCTACACCTTACCAACTACGGCATGAACTGGGTC
CGACAGGCCCTGGCAAAGGCCTTGAATGGGTCGGATGGATCAACACCTACACCGG
CGAGCCAACATACGCCGCCGACTTCAAGCGGAGATTCACCTTACGCCTGGACACCA
GCAAGAGCACCGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTG
TACTACTGCGCCAAGTATCCCCACTACTACGGCAGCAGCCACTGGTACTTTGACGTG
TGGGGACAGGGCACACTGGTCACAGTGTCTAGCGCCTTACAAAGGGCCCCAGCGT
TTTCCCCTGGCTCCTAGCAGCAAGTCTACCAGCGGAGGAACAGCCGCTCTGGGCTG
TCTGGTCAAGGACTACTTTCCCAGCCTGTGACCGTGTCTGGAATTCTGGCGCTCT
GACAAGCGGCGTGCACACCTTCCAGCTGTGCTGCAAAGCAGCGGCCTGTACTCTCT

GAGCAGCGTCGTGACAGTGCCAAGCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCA
ATGTGAACCACAAGCCTAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGAG
CTGCGACAAGACCCACACCTGTCCTCCATGTCCTGCTCCAGAACTGCTCGGC GGACC
TTCCGTGTTCTGTTTCTCCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCC
TGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCCACGAGGATCCCGAAGTGAAGTTCA
ATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGA
ACAGTACAACAGCACCTACAGAGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGATT
GGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCTCCT
ATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACCCCAAGTTTACAC
ACTGCCTCCAAGCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTCG
TGAAGGGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAATGGCCAGCCA
GAGAACA ACTACAAGACAACCCCTCCTGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTTCTG
TACAGCAAGCTGACAGTGGACAAGTCCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTTACAGCTG
CAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCTCTGAGCCTGT
CTCCTGGCAAG

[0294] Иллюстративная аминокислотная последовательность тяжелой цепи бевацизумаба (SEQ ID NO: 24)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINTYTGE
PTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGSSHWYFDVWG
QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKV
HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP
PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN
AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR
EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS
FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0295] Иллюстративная нуклеотидная последовательность легкой цепи бевацизумаба (SEQ ID NO: 109)

GACATCCAGATGACACAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCCTCTGTGGGAGACAGAGT
GACCATCACCTGTAGCGCCAGCCAGGACATCTCCA ACTACCTGAACTGGTATCAGCA
AAAGCCCGGCAAGGCCCTAAGGTGCTGATCTACTTCACAAGCAGCCTGCACTCCG
GCGTGCCCAGCAGATTTTCTGGCTCTGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGACCATAT
CTAGCCTGCAGCCTGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTACAGCACCGTGC
CTTGACATTTGGCCAGGGCACAAAGGTGGAATCAAGCGGACTGTGGCCGCTCCT

AGCGTGTTCATCTTTCCACCTAGCGACGAGCAGCTGAAGTCTGGCACAGCCTCTGTC
GTGTGCCTGCTGAACAACCTTCTACCCCAGAGAAGCCAAGGTGCAGTGGAAAGTGGA
CAATGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAAGAGAGCGTGACAGAGCAGGACTCCAAG
GATAGCACCTATAGCCTGAGCAGCACCTGACACTGAGCAAGGCCGACTACGAGAA
GCACAAAGTGTACGCCTGCGAAGTGACCCACCAGGGCCTTTCTAGCCCTGTGACCA
AGAGCTTCAACCGGGGCGAATGT

[0296] Иллюстративная аминокислотная последовательность легкой цепи бевацизумаба (SEQ ID NO: 25)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCSASQDISNYLNWYQQKPKAPKVLIIYFTSSLHSGVPS
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS
DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTL
TLISKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

VEGF TRAP

[0297] Растворимый рецептор VEGF (также называемый в данном документе VEGF TRAP) представляет собой полипептид, который содержит часть внеклеточной области одного или более (например, двух или трех) рецепторов VEGF млекопитающих (например, одного или более из VEGFR-1, VEGFR-2 и VEGFR-3), функционально связанную с сигнальным пептидом (например, любым из иллюстративных сигнальных пептидов, описанных в данном документе), причем растворимый рецептор VEGF способен специфически связываться с одним или более белком(ами) VEGF млекопитающих (например, одним или более (например, двумя, тремя или четырьмя) из VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C и VEGF-D, например, одним или более (например, двумя, тремя или четырьмя) из VEGF-A человека дикого типа, VEGF-B человека дикого типа, VEGF-C человека дикого типа и VEGF-D человека дикого типа).

[0298] В некоторых примерах растворимый рецептор VEGF содержит часть (например, от около 10 аминокислот до около 732 аминокислот, от около 10 аминокислот до около 700 аминокислот, от около 10 аминокислот до около 650 аминокислот, от около 10 аминокислот до около 600 аминокислот, от около 10 аминокислот до около 550 аминокислот, от около 10 аминокислот до около 500 аминокислот, от около 10 аминокислот до около 450 аминокислот, от около 10 аминокислот до около 400 аминокислот, от около 10 аминокислот до около 350 аминокислот, от около 10 аминокислот до около 300 аминокислот, от около 10 аминокислот до около 250 аминокислот, от около 10 аминокислот до около 200 аминокислот, от около 10 аминокислот до около 150 аминокислот, от около 10 аминокислот

аминокислот до около 732 аминокислот, от около 650 аминокислот до около 700 аминокислот или от около 700 аминокислот до около 732 аминокислот) внеклеточной области VEGFR-1 (например, смежную последовательность VEGFR-1 человека дикого типа (например, смежную последовательность, включающую один или более (например, один, два, три, четыре, пять, шесть или семь) иммуноглобулин-подобных доменов во внеклеточной области VEGFR-1 человека дикого типа (например, SEQ ID NO: 27, 29, 31 или 33) или последовательность, которая по меньшей мере на 80% (например, по меньшей мере на 82%, по меньшей мере на 84%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99%) идентична смежной последовательности VEGFR-1 человека дикого типа, например, последовательность, которая по меньшей мере на 80% (например, по меньшей мере на 82%, по меньшей мере на 84%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99%) идентична смежной последовательности в SEQ ID NO: 27, 29, 31 или 33.

[0299] В некоторых примерах растворимый рецептор VEGF содержит часть (например, от около 20 аминокислот до около 745 аминокислот или любой из поддиапазонов этого диапазона, описанного в данном документе) внеклеточной области VEGFR-2 (например, смежную последовательность VEGFR-2 человека дикого типа (например, смежную последовательность, включающую один или более (например, один, два, три, четыре, пять, шесть или семь) иммуноглобулиноподобных доменов во внеклеточной области VEGFR-2 человека дикого типа (например, SEQ ID NO: 35) или последовательность, которая по меньшей мере на 80% (например, по меньшей мере на 82%, по меньшей мере на 84%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99%) идентична смежной последовательности VEGFR-2 человека дикого типа, например, последовательность, которая по меньшей мере на 80% (например, по меньшей мере на 82%, по меньшей мере на 84%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99%) идентична смежной последовательности в SEQ ID NO: 35).

[0300] В некоторых примерах растворимый рецептор VEGF содержит часть внеклеточной области VEGFR-1 (например, любую из частей внеклеточной области

VEGFR-1, описанных в данном документе) и часть внеклеточной области VEGFR-2 (например, любую из частей внеклеточной области VEGFR-2, описанных в данном документе). Например, растворимый рецептор VEGF может содержать один или более (например, два, три, четыре, пять, шесть или семь) иммуноглобулин-подобных доменов во внеклеточной области VEGFR-1 человека дикого типа и один или более (например, два, три, четыре, пять, шесть или семь) иммуноглобулин-подобных доменов во внеклеточной области VEGFR-2 человека дикого типа (например, афлиберцепт).

[0301] В некоторых примерах растворимый рецептор VEGF содержит часть (например, от около 20 аминокислот до около 751 аминокислоты или любой из поддиапазонов этого диапазона, описанного в данном документе) внеклеточной области VEGFR-3 (например, смежную последовательность VEGFR-3 человека дикого типа (например, смежную последовательность, включающую один или более (например, один, два, три, четыре, пять, шесть или семь) иммуноглобулин-подобных доменов во внеклеточной области VEGFR-3 человека дикого типа (например, SEQ ID NO: 37, 39 или 41) или последовательность, которая по меньшей мере на 80% (например, по меньшей мере на 82%, по меньшей мере на 84%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99%) идентична смежной последовательности VEGFR-3 человека дикого типа, например, последовательность, которая по меньшей мере на 80% (например, по меньшей мере на 82%, по меньшей мере на 84%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99%) идентична смежной последовательности в SEQ ID NO: 37, 39 или 41.

[0302] В данном документе описаны неограничивающие примеры внеклеточных областей различных VEGFR-1 млекопитающих, различных VEGFR-2 млекопитающих и различных VEGFR-3 млекопитающих. В данном документе описаны неограничивающие примеры белковых и нуклеотидных последовательностей, кодирующих белок рецептора VEGF дикого типа. Как может оценить специалист в данной области, замена в аминокислоте, которая сохраняется между видами, с большей вероятностью приведет к изменению функции белка, в то время как замена в положении аминокислоты, которая не сохраняется между видами, с меньшей вероятностью окажет влияние на функцию белка.

[0303] Ген VEGFR-1, обнаруживаемый в хромосомном положении 13q12.3 человека, кодирует 33 экзон-содержащий член семейства рецепторов фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR). Члены семейства VEGFR являются рецепторными тирозинкиназами

(RTK), которые содержат внеклеточную лиганд-связывающую область с семью иммуноглобулин (Ig)-подобными доменами, трансмембранный сегмент и домен тирозинкиназы (ТК) в цитоплазматическом домене. Этот белок связывается с VEGF-А, VEGF-В и плацентарным фактором роста и играет важную роль в ангиогенезе и васкулогенезе. Экспрессия этого рецептора обнаруживается в эндотелиальных клетках сосудов, плацентарных клетках трофобласта и моноцитах периферической крови. Было обнаружено несколько вариантов транскриптов, кодирующих различные изоформы этого гена. Изоформы включают полноразмерную трансмембранную изоформу рецептора и укороченные растворимые изоформы.

[0304] Иллюстративная последовательность кДНК изоформы 1 VEGFR-1 человека (SEQ ID NO: 26)

ATCGAGGTCCGCGGGAGGCTCGGAGCGCGCCAGGCGGACACTCCTCTCGGCTCCTC
CCCGGCAGCGGCGGCGGCTCGGAGCGGGCTCCGGGGCTCGGGTGCAGCGGCCAGCG
GGCGCCTGGCGGCGAGGATTACCCGGGGAAGTGGTTGTCTCCTGGCTGGAGCCGCG
AGACGGGCGCTCAGGGCGCGGGGCCGGCGGGCGGAACGAGAGGACGGACTCTGG
CGGCCGGGTCGTTGGCCGCGGGGAGCGCGGGCACCGGGCGAGCAGGCCGCGTCGCG
CTCACCATGGTCAGCTACTGGGACACCGGGGTCTTGCTGTGCGCGCTGCTCAGCTGT
CTGCTTCTCACAGGATCTAGTTCAGGTTCAAAATTAAGATCCTGAACTGAGTTTA
AAAGGCACCCAGCACATCATGCAAGCAGGCCAGACACTGCATCTCCAATGCAGGGG
GGAAGCAGCCATAAATGGTCTTTGCCTGAAATGGTGAGTAAGGAAAGCGAAAGGC
TGAGCATAACTAAATCTGCCTGTGGAAGAAATGGCAAACAATTCTGCAGTACTTTAA
CCTTGAACACAGCTCAAGCAAACCACACTGGCTTCTACAGCTGCAAATATCTAGCTG
TACCTACTTCAAAGAAGAAGGAAACAGAATCTGCAATCTATATATTTATTAGTGATA
CAGGTAGACCTTTCGTAGAGATGTACAGTGAAATCCCCGAAATTATACACATGACTG
AAGGAAGGGAGCTCGTCATTCCTGCCGGGTTACGTCACCTAACATCACTGTTACTT
TAAAAAAGTTTCCACTTGACACTTTGATCCCTGATGGAAAACGCATAATCTGGGACA
GTAGAAAGGGCTTCATCATATCAAATGCAACGTACAAAGAAATAGGGCTTCTGACC
TGTGAAGCAACAGTCAATGGGCATTTGTATAAGACAACTATCTCACACATCGACA
AACCAATACAATCATAGATGTCCAAATAAGCACACCACGCCAGTCAAATTACTTA
GAGGCCATACTCTTGTCCCTCAATTGTAAGTACTGCTACCACTCCCTTGAACACGAGAGTTC
AAATGACCTGGAGTTACCCTGATGAAAAAATAAGAGAGCTTCCGTAAGGCGACGA
ATTGACCAAAGCAATTCCCATGCCAACAATTTCTACAGTGTTCTTACTATTGACAAA
ATGCAGAACAAAGACAAAGGACTTTATACTTGTCTGTGTAAGGAGTGGACCATCATT
CAAATCTGTTAACACCTCAGTGCATATATATGATAAAGCATTTCATCACTGTGAAACA

TCGAAAACAGCAGGTGCTTGAAACCGTAGCTGGCAAGCGGTCTTACCGGCTCTCTAT
GAAAGTGAAGGCATTTCCCTCGCCGGAAGTTGTATGGTTAAAAGATGGGTTACCTGC
GACTGAGAAATCTGCTCGCTATTTGACTCGTGGCTACTCGTTAATTATCAAGGACGT
AACTGAAGAGGATGCAGGGAATTATACAATCTTGCTGAGCATAAAACAGTCAAATG
TGTTTAAAACCTCACTGCCACTCTAATTGTCAATGTGAAACCCCAGATTTACGAAA
AGGCCGTGTCATCGTTTCCAGACCCGGCTCTCTACCCACTGGGCAGCAGACAAATCC
TGACTTGTACCGCATATGGTATCCCTCAACCTACAATCAAGTGGTTCTGGCACCCCT
GTAACCATAATCATTCCGAAGCAAGGTGTGACTTTTGTTC AATAATGAAGAGTCCT
TTATCCTGGATGCTGACAGCAACATGGGAAACAGAATTGAGAGCATCACTCAGCGC
ATGGCAATAATAGAAGGAAAGAATAAGATGGCTAGCACCTTGGTTGTGGCTGACTC
TAGAATTTCTGGAATCTACATTTGCATAGCTTCCAATAAAGTTGGGACTGTGGGAAG
AAACATAAGCTTTTATATCACAGATGTGCCAAATGGGTTTCATGTTA ACTTGGAAAA
AATGCCGACGGAAGGAGAGGACCTGAAACTGTCTTGACAGTTAACAAGTTCTTAT
ACAGAGACGTTACTTGGATTTTACTGCGGACAGTTAATAACAGAACAATGCACTAC
AGTATTAGCAAGCAAAAATGGCCATCACTAAGGAGCACTCCATCACTCTTAATCTT
ACCATCATGAATGTTTCCCTGCAAGATTCAGGCACCTATGCCTGCAGAGCCAGGAAT
GTATACACAGGGGAAGAAATCCTCCAGAAGAAAGAAATTACAATCAGAGATCAGG
AAGCACCATACCTCCTGCGAAACCTCAGTGATCACACAGTGGCCATCAGCAGTTCCA
CCACTTTAGACTGTCATGCTAATGGTGTCCCCGAGCCTCAGATCACTTGGTTTAAAA
ACAACCACAAAATACAACAAGAGCCTGGAATTATTTTAGGACCAGGAAGCAGCACG
CTGTTTATTGAAAGAGTCACAGAAGAGGATGAAGGTGTCTATCACTGCAAAGCCAC
CAACCAGAAGGGCTCTGTGGAAAGTTCAGCATACTCACTGTTCAAGGAACCTCGG
ACAAGTCTAATCTGGAGCTGATCACTCTAACATGCACCTGTGTGGCTGCGACTCTCT
TCTGGCTCCTATTAACCCTCTTTATCCGAAAAATGAAAAGGTCTTCTTCTGAAATAA
AGACTGACTACCTATCAATTATAATGGACCCAGATGAAGTTCCTTTGGATGAGCAGT
GTGAGCGGCTCCCTTATGATGCCAGCAAGTGGGAGTTTGCCCGGGAGAGACTTAAA
CTGGGCAAATCACTTGGAAAGAGGGGCTTTTGGAAAAGTGGTTCAAGCATCAGCATT
TGGCATTAAGAAATCACCTACGTGCCGACTGTGGCTGTGAAAATGCTGAAAGAGG
GGCCACGGCCAGCGAGTACAAAGCTCTGATGACTGAGCTAAAATCTTGACCCAC
ATTGGCCACCATCTGAACGTGGTTAACCTGCTGGGAGCCTGCACCAAGCAAGGAGG
GCCTCTGATGGTGATTGTTGAATACTGCAAATATGGAAATCTCTCCA ACTACCTCAA
GAGCAAACGTGACTTATTTTTTCTCAACAAGGATGCAGCACTACACATGGAGCCTAA
GAAAGAAAAAATGGAGCCAGGCCTGGAACAAGGCAAGAAACCAAGACTAGATAGC
GTCACCAGCAGCGAAAGCTTTGCGAGCTCCGGCTTTCAGGAAGATAAAAAGTCTGAG

TGATGTTGAGGAAGAGGAGGATTCTGACGGTTTCTACAAGGAGCCCATCACTATGG
AAGATCTGATTTCTTACAGTTTTCAAGTGGCCAGAGGCATGGAGTTCCTGTCTTCCA
GAAAGTGCATTCATCGGGACCTGGCAGCGAGAAACATTCTTTTATCTGAGAACAAC
GTGGTGAAGATTTGTGATTTTGGCCTTGCCCGGATATTTATAAGAACCCCGATTAT
GTGAGAAAAGGAGATACTCGACTTCCTCTGAAATGGATGGCTCCTGAATCTATCTTT
GACAAAATCTACAGCACCAAGAGCGACGTGTGGTCTTACGGAGTATTGCTGTGGGA
AATCTTCTCCTTAGGTGGGTCTCCATACCCAGGAGTACAAATGGATGAGGACTTTTG
CAGTCGCCTGAGGGAAGGCATGAGGATGAGAGCTCCTGAGTACTCTACTCCTGAAA
TCTATCAGATCATGCTGGACTGCTGGCACAGAGACCCAAAAGAAAGGCCAAGATTT
GCAGAACTTGTGGAAAACTAGGTGATTTGCTTCAAGCAAATGTACAACAGGATGG
TAAAGACTACATCCCAATCAATGCCATACTGACAGGAAATAGTGGGTTTACATACTC
AACTCCTGCCTTCTCTGAGGACTTCTTCAAGGAAAGTATTTTCAAGCTCCGAAGTTTAA
TTCAGGAAGCTCTGATGATGTCAGATACGTAAATGCTTTCAAGTTCATGAGCCTGGA
AAGAATCAAACCTTTGAAGAACTTTTACCGAATGCCACCTCCATGTTTGATGACTA
CCAGGGCGACAGCAGCACTCTGTTGGCCTCTCCCATGCTGAAGCGCTTACCTGGAC
TGACAGCAAACCCAAGGCTCGCTCAAGATTGACTTGAGAGTAACCAGTAAAAGTA
AGGAGTCGGGGCTGTCTGATGTCAGCAGGCCAGTTTCTGCCATTCCAGCTGTGGGC
ACGTCAGCGAAGGCAAGCGCAGGTTACCTACGACCACGCTGAGCTGGAAAGGAAA
ATCGCGTGCTGCTCCCCGCCCCAGACTACAACCTCGGTGGTCTGTACTCCACCCCA
CCCATCTAGAGTTTGACACGAAGCCTTATTTCTAGAAGCACATGTGTATTTATACCC
CCAGGAAACTAGCTTTTGCCAGTATTATGCATATATAAGTTTACACCTTTATCTTTCC
ATGGGAGCCAGCTGCTTTTTGTGATTTTTTTAATAGTGCTTTTTTTTTTTTACTAACA
AGAATGTA ACTCCAGATAGAGAAATAGTGACAAGTGAAGAACA CTACTGCTAAATC
CTCATGTTACTCAGTGTTAGAGAAATCCTTCCTAAACCAATGACTTCCTGCTCCA
ACCCCGCCACCTCAGGGCACGCAGGACCAGTTTGATTGAGGAGCTGCACTGATCA
CCCAATGCATCACGTACCCCACTGGGCCAGCCCTGCAGCCAAAACCCAGGGCAAC
AAGCCCGTTAGCCCCAGGGATCACTGGCTGGCCTGAGCAACATCTCGGGAGTCTCT
AGCAGGCCTAAGACATGTGAGGAGGAAAAGGAAAAAAGCAAAAAGCAAGGGAG
AAAAGAGAAACCGGGAGAAGGCATGAGAAAGAATTTGAGACGCACCATGTGGGCA
CGGAGGGGGACGGGGCTCAGCAATGCCATTTTCAAGTGGCTTCCAGCTCTGACCCTTC
TACATTTGAGGGCCAGCCAGGAGCAGATGGACAGCGATGAGGGGACATTTTCTGG
ATTCTGGGAGGCAAGAAAAGGACAAATATCTTTTTTGGAACTAAAGCAAATTTTAG
AACTTTACCTATGGAAGTGGTCTATGTCCATTCTCATTCTGCGTGGCATGTTTTGATTTG
TAGCACTGAGGGTGGCACTCAACTCTGAGCCATACTTTTGGCTCCTCTAGTAAGAT

GCACTGAAAACCTTAGCCAGAGTTAGGTTGTCTCCAGGCCATGATGGCCTTACACTGA
AAATGTCACATTCTATTTTGGGTATTAATATATAGTCCAGACACTTAACTCAATTTCT
TGGTATTATTCTGTTTTGCACAGTTAGTTGTGAAAGAAAGCTGAGAAGAATGAAAAT
GCAGTCCTGAGGAGAGGAGTTTTCTCCATATCAAAACGAGGGCTGATGGAGGAAAA
AGGTCAATAAGGTCAAGGGAAAACCCCGTCTCTATAACCAACCAACCAATTCACCA
ACACAGTTGGGACCCAAAACACAGGAAGTCAGTCACGTTTCCTTTTCATTTAATGGG
GATTCACACTATCTCACACTAATCTGAAAGGATGTGGAAGAGCATTAGCTGGCGCATA
TTAAGCACTTTAAGCTCCTTGAGTAAAAAGGTGGTATGTAATTTATGCAAGGTATTT
CTCCAGTTGGGACTCAGGATATTAGTTAATGAGCCATCACTAGAAGAAAAGCCCATT
TTCAACTGCTTTGAAACTTGCCTGGGGTCTGAGCATGATGGGAATAGGGAGACAGG
GTAGGAAAGGGCGCCTACTCTTCAGGGTCTAAAGATCAAGTGGGCCTTGATCGCT
AAGCTGGCTCTGTTTGATGCTATTTATGCAAGTTAGGGTCTATGTATTTATGATGTCT
GCACCTTCTGCAGCCAGTCAGAAGCTGGAGAGGCAACAGTGGATTGCTGCTTCTTGG
GGAGAAGAGTATGCTTCCTTTTATCCATGTAATTTAACTGTAGAACCTGAGCTCTAA
GTAACCGAAGAATGTATGCCTCTGTTCTTATGTGCCACATCCTTGTTTAAAGGCTCTC
TGTATGAAGAGATGGGACCGTCATCAGCACATTCCCTAGTGAGCCTACTGGCTCCTG
GCAGCGGCTTTTGTGGAAGACTCACTAGCCAGAAGAGAGGAGTGGGACAGTCCTCT
CCACCAAGATCTAAATCCAAACAAAAGCAGGCTAGAGCCAGAAGAGAGGACAAAT
CTTTGTTCTTCCTCTTCTTTACATACGCAAACCACCTGTGACAGCTGGCAATTTTATA
AATCAGGTA ACTGGAAGGAGGTTAAACACAGAAAAAAGAAGACCTCAGTCAATTCT
CTACTTTTTTTTTTTTTTCCAAATCAGATAATAGCCCAGCAAATAGTGATAACAAATA
AAACCTTAGCTATTCATGTCTTGATTTCATAATTAATTCTTAATCATTAAAGAGACCA
TAATAAATACTCCTTTTCAAGAGAAAAGCAAACCATTAGAATTGTTACTCAGCTCC
TTCAA ACTCAGGTTTGTAGCATA CATGAGTCCATCCATCAGTCAAAGAATGGTTCCA
TCTGGAGTCTTAATGTAGAAAGAAAAATGGAGACTTGTAATAATGAGCTAGTTACA
AAGTGCTTGTTCAATAAAATAGCACTGAAAATTGAAACATGAATTA ACTGATAATAT
TCCAATCATTGCCATTTATGACAAAAATGGTTGGCACTAACAAAGAACGAGCACTT
CCTTTCAGAGTTTCTGAGATAATGTACGTGGAACAGTCTGGGTGGAATGGGGCTGAA
ACCATGTGCAAGTCTGTGTCTTGTGTCAGTCCAAGAAGTGACACCGAGATGTTAATTTT
AGGGACCCGTGCCTTGTTTCCTAGCCCACAAGAATGCAAACATCAAACAGATACTC
GCTAGCCTCATTTAAATTGATTAAAGGAGGAGTGCATCTTTGGCCGACAGTGGTGTA
ACTGTATGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGGGTGTATGTGTGTTTT
GTGCATAACTATTTAAGGAACTGGAATTTTAAAGTTACTTTTATACAAACCAAGAA
TATATGCTACAGATATAAGACAGACATGGTTTGGTCCTATATTTCTAGTCATGATGA

ATGTATTTTGTATACCATCTTCATATAATAAACTTCCAAAAACACA

[0305] Иллюстративная аминокислотная последовательность предшественника изоформы 1 VEGFR-1 человека (SEQ ID NO: 27)

MVSYWDTGVLLCALLSCLLLTGSSSGSKLKDPELSLKGQTQHIMQAGQTLHLQCRGEAA
HKWSLPEMVSKESERLSITKSACGRNGKQFCSTLTLNTAQANHTGFYSCKYLAVPTSKK
KETESAIYIFISDTGRPFVEMYSEIPEIHMTEGRELVIPCRVTSFNITVTLKKFPLDTLIPDG
KRIIWDSRKGFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVQISTPRPVKLL
RGHTLVLNCTATTPLNTRVQMTWSYPDEKNKRASVRRRIDQSNHANIFYSVLTIDKMQ
NKDKGLYTCRVRSGPSFKSVNTSVHIYDKAFITVKHRKQQVLETVAGKRSYRLSMKVK
AFPSPEVVWLKDGLPATEKSARYLTRGYSLIKDVTEEDAGNYTILLSIKQSNVFKNLTA
TLIVNVKPKQIYEKAVSSFPDPALYPLGSRQILCTAYGIPQPTIKWFWHPCNHNHSEARC
DFCSNNEESFILDADSNMGNRIESITQRMALIEGKNKMASTLVVADSRISGIYICIASNKVG
TVGRNISFYITDVPNGFHVNLKMPTEGEDLKLSTVNKFLYRDVTWILLRTVNNRTMH
YSISKQKMAITKEHSITLNLTIMNVSLQDSGTACRARNVYTGEEILQKKEITIRDQEAPY
LLRNLSDHTVAISSSTLDCHANGVPEPQITWFKNNHKIQEPGILGPGSSTLFIERVTEE
DEGVYHCKATNQKGSVESSAYLTVQGTSDKSNLELITLTCTCVAATLFWLLTLFIRKM
KRSSSEIKTDYLSIIMDPDEVPLDEQCERLPYDASKWEFARERLKLKSLGRGAFGKVVQ
ASAFGIKKSPTCRTCVAVKMLKEGATASEYKALMTELKILTHIGHHLNVVNLGACTKQ
GGPLMVIVEYCKYGNLSNYLKSKRDLFFLNKDAALHMEPKKEKMEPGLEQGKKPRLDS
VTSSSEFASSGFQEDKSLSDVEEEEDSDGFYKEPITMEDLISYSFQVARGMEFLSSRKCIH
RDLAARNILLSENNVMKICDFGLARDIYKNPDYVRKGDTRLPLKWMAPESIFDKIYSTKS
DVWSYGVLLWEIFSLGGSPYPGVQMDDEFCSRLREGMRMRAPEYSTPEIYQIMLDCWH
RDPKERPRFAELVEKLGDLLQANVQQDGKDYIPINAILTGNSGFTYSTPAFSEDFKESIS
APKFNSGSSDDVRYVNAFKFMSLERIKTFEELLPNATSMFDDYQGDSSTLLASPMLKRF
TWTDSKPKASLKIDLRVTSKSKESGLSDVSRPSFCHSSCGHVSEGKRRFTYDHAELERKI
ACCSPPPDYNSVVLYSTPPI

[0306] Этот вариант (2), также известный как sFlt1 или sVEGFR-1, отличается 3'-кодирующей областью и 3'-UTR, по сравнению с вариантом 1. Кодированный растворимый белок (изоформа 2) имеет более короткий, выраженный С-концевой участок и лишен трансмембранной и цитоплазматической областей изоформы 1.

[0307] Иллюстративная последовательность кДНК изоформы 2 VEGFR-1 человека (также известной как sVEGFR-1) (SEQ ID NO: 28)

ATCGAGGTCCGCGGGAGGCTCGGAGCGCGCCAGGCGGACACTCCTCTCGGCTCCTC

CCCGGCAGCGGCGGCGGCTCGGAGCGGGCTCCGGGGCTCGGGTGCAGCGGCCAGCG
GGCGCCTGGCGGCGAGGATTACCCGGGGAAGTGGTTGTCTCCTGGCTGGAGCCGCG
AGACGGGCGCTCAGGGCGCGGGGCCGGCGGGCGGCGAACGAGAGGACGGACTCTGG
CGGCCGGGTCGTTGGCCGCGGGGAGCGCGGGCACCGGGCGAGCAGGCCGCGTCGCG
CTCACCATGGTCAGCTACTGGGACACCGGGGTCTGCTGTGCGCGCTGCTCAGCTGT
CTGCTTCTCACAGGATCTAGTTCAGGTTCAAATTTAAAGATCCTGAACTGAGTTTA
AAAGGCACCCAGCACATCATGCAAGCAGGCCAGACACTGCATCTCCAATGCAGGGG
GGAAGCAGCCATAAATGGTCTTTGCCTGAAATGGTGAGTAAGGAAAGCGAAAGGC
TGAGCATAACTAAATCTGCCTGTGGAAGAAATGGCAAACAATTCTGCAGTACTTTAA
CCTTGAACACAGCTCAAGCAAACCACACTGGCTTCTACAGCTGCAAATATCTAGCTG
TACCTACTTCAAAGAAGAAGGAAACAGAATCTGCAATCTATATATTTATTAGTGATA
CAGGTAGACCTTTCGTAGAGATGTACAGTGAAATCCCCGAAATTATACACATGACTG
AAGGAAGGGAGCTCGTCATTCCCTGCCGGGTACGTCACCTAACATCACTGTTACTT
TAAAAAAGTTTCCACTTGACACTTTGATCCCTGATGGAAAACGCATAATCTGGGACA
GTAGAAAGGGCTTCATCATATCAAATGCAACGTACAAAGAAATAGGGCTTCTGACC
TGTGAAGCAACAGTCAATGGGCATTTGTATAAGACAAACTATCTCACACATCGACA
AACCAATACAATCATAGATGTCAAATAAGCACACCACGCCAGTCAAATTA
GAGGCCATACTCTTGTCCTCAATTGTACTGCTACCACTCCCTTGAACACGAGAGTTC
AAATGACCTGGAGTTACCCTGATGAAAAAATAAGAGAGCTTCCGTAAGGCGACGA
ATTGACCAAAGCAATTCCCATGCCAACATATTCTACAGTGTTCTTACTATTGACAAA
ATGCAGAACAAAGACAAAGGACTTTATACTTGTCGTGTAAGGAGTGGACCATCATT
CAAATCTGTTAACACCTCAGTGCATATATATGATAAAGCATTCACTGTGAAACA
TCGAAAACAGCAGGTGCTTGAAACCGTAGCTGGCAAGCGGTCTTACCGGCTCTCTAT
GAAAGTGAAGGCATTTCCCTCGCCGGAAGTTGTATGGTTAAAAGATGGGTACCTGC
GACTGAGAAATCTGCTCGCTATTTGACTCGTGGCTACTCGTTAATTATCAAGGACGT
AACTGAAGAGGATGCAGGGAATTATACAATCTTGCTGAGCATAAAACAGTCAAATG
TGTTTAAAAACCTCACTGCCACTCTAATTGTCAATGTGAAACCCAGATTTACGAAA
AGGCCGTGTCATCGTTTCCAGACCCGGCTCTCTACCCACTGGGCAGCAGACAAATCC
TGACTTGTACCGCATATGGTATCCCTCAACCTACAATCAAGTGGTTCTGGCACCCCT
GTAACCATAATCATTCCGAAGCAAGGTGTGACTTTTGTTC AATAATGAAGAGTCCT
TTATCCTGGATGCTGACAGCAACATGGGAAACAGAATTGAGAGCATCACTCAGCGC
ATGGCAATAATAGAAGGAAAGAATAAGATGGCTAGCACCTTGGTTGTGGCTGACTC
TAGAATTTCTGGAATCTACATTTGCATAGCTTCCAATAAAGTTGGGACTGTGGGAAG
AAACATAAGCTTTTATATCACAGATGTGCCAAATGGGTTTCATGTTA ACTTGAAAA

AATGCCGACGGAAGGAGAGGACCTGAAACTGTCTTGCACAGTTAACAAGTTCTTAT
ACAGAGACGTTACTTGGATTTTACTGCGGACAGTTAATAACAGAACAATGCACTAC
AGTATTAGCAAGCAAAAAATGGCCATCACTAAGGAGCACTCCATCACTCTTAATCTT
ACCATCATGAATGTTTCCCTGCAAGATTCAGGCACCTATGCCTGCAGAGCCAGGAAT
GTATACACAGGGGAAGAAATCCTCCAGAAGAAAGAAATTACAATCAGAGGTGAGC
ACTGCAACAAAAAGGCTGTTTTCTCTCGGATCTCCAAATTTAAAAGCACAAGGAATG
ATTGTACCACACAAAGTAATGTAAAACATTAAAGGACTCATTA AAAAGTAACAGTT
GTCTCATATCATCTTGATTTATTGTCACTGTTGCTAACTTTCAGGCTCGGAGGAGATG
CTCCTCCCAAAATGAGTTCGGAGATGATAGCAGTAATAATGAGACCCCCGGGCCCC
AGCTCTGGGCCCCCATTTCAGGCCGAGGGGGCTGCTCCGGGGGGCCGACTTGGTGC
ACGTTTGGATTTGGAGGATCCCTGCACTGCCTTCTCTGTGTTTGTGCTCTTGCTGTT
TTCTCCTGCCTGATAAACAACA ACTTGGGATGATCCTTTCCTTCCATTTTGATGCCAA
CCTCTTTTTATTTTTAAGTGTTGAAGCTGCACAACTGAATAATTTAAACAAATGCTG
GTTTCTGCCAAAGATGGACACGAATAAGTTAATTTTCCAGCTCAGAATGAGTACAGT
TGAATTTGAGACTCTGTTCGGACTTCTGCCTGGTTTTATTTGGGACTATTTTCATCTGCT
CTTGATTTGTAAATAGCACCTGGATAGCAAGTTATAATGCTTATTTATTTGAAAATG
CTTTTTTTTTTTTTACGTTAAGCACATTTATCTTGA ACTGGAGCTTCTAAAATGGGCC
CCAGGGGTGCAAGATGTTGGTGTAAATTCAGAGATAGTAAAGGTTTATCGCAGTGTG
AATTATAAGAGTCCATCCAAATCAACGTCCCCTCCCTCCTCTCATGCGATCCAGGTA
ATTATGCAGTTAGTGCCACAGTAGACTAGCCTAGCAAAGGGTTTGCTCCTTGCTGTC
TCTGACTGCACCACACAGCTATTGATGGCAGCTGAAAGAAAGTGGATCATGCCTTA
ATTTTAAATATTCCTGTCCTCTGGTTATTATTTTTAAGGAACTTCATCATGTTAAAATG
ACAGCATTCAAAGGTGTACCACAATCAATTTATCAAGGAAATAAAGGCTATTGTAA
CCAGAGATTTAATGCATTCTTCTAAATGTAAATTTAAAATTTGCCCTTTAAAAAAGT
CCACTTTCCCATATGCAAATGTTAATAGGATTTTTATGGGGATTAAGAAGCGGCAA
AACTACAGAAGCAGAATTCAAAGTAATTTAAAAAATACACACCAGTTTTAAATCAA
GAGAAGTTGTAATCTCTTGTTTTAAGCTTGC GTTTGAGGGAAAATGACTTTTTACC
AATTTAATATGCATTGTTCTGTTGTTTTTATTTATGATTGATCATTATATGTGACTTGC
ATAAACTATTTAAAAA AAAAAACTATAATGACCAAATAGCCATGGCTGAGAAACA
CAGTGGCTGGGCAGTTCAATAGGAGGTGACAATATGACA ACTTCTCAAGCTTGGGA
ACTCACCAGACTGTTTCCTCCTTTAGGTAACAGATTCTGTCCCACGGCTAAACTTGTC
TTTCACGTGGGAATTGCTTTTGTCAAACGTGAAAGAGTAAACAATAGCATTTCCTCA
GAATGCCAGTTTTATGGAGCCCCAAATGCTCTGAAAACAATTAGTAACCTGGAAGTT
GTCAGCCCAAAGGAAAGAAAAATCAATTGTATCTTGAAATTTTACCTATGGCTCTTT

GGCCTGGCTTCTTTGTTTCATTATAAGTTAGTGTGTTCCCTTCAGGAAACAATGCCTTAA
TACCATAGAACATGGGGGCCTTAATAGTTGCTAACATTAAAAAAGCAAACAGAATG
ATTGAGGGATCCTTATGAAAACAAAATGGTGAATTGGACATGCAGAACCTACCATT
TCCTTCCCCTGTTTGAATTTTTGTGGGGAGGGGAGGATGTTAGTATTTACAAAAGA
TGATTTTAAGAACTTCCAAGAGATGAGTTTAAGAATTCCATAGAGTATTAGTTGTTC
ACTGTGTAATTAATCCTTCCGGAGAGTCTTTTTTTTTTTTTTAAAGAACTTTTGGG
TGGGTTTTGTTTTTATTAGTTACCCTAGGGGTATGTTACCCTGGGGTATGAAGGGA
GGTGAAGATAACGGAGGGGGGAGAAAAAAAAAAGGAGAAAAAAGGAGCCTAAAA
TGGGGAATAATTGAAATGGAACAGGGGGTGTGAGGCTGGTTCCTCAGTCCCCATTC
CAAACGGAGGATAGAAGCTGTGTATTTATGTGACCTGGCAGATCTCTGGGGCCATA
ACACTGAAAAGTGAAAGAACCTGGTGGGCAGCTATCTTTGGCTACTGATAACCAGC
AGAAATGTCTGTTAATTCTGATTTTCTCAATTTGAAGGGATCAGCTACACTGTTAAA
TTTTGGAAAGCCACTACCTACTTCCATCAAGTAACTTAGGTTTCGAAATATGGGTTC
AACGCACCTCCCTTATTCAAAATGTCAAAATAGATTATTATAATGTATAAAGTAAGA
ATTGACAAAATATGATTCTTGGGTGATTGGTCATTTAGAAACTAGCCAAAAGTGAG
ACTTTTAATGTAGAACATTTTTCAGAAATGGGTACAAAGAAAAATGCATATTACTGT
ATATTCAGAGTGTTTATGTGAACCTTGTATTTAATTGAGAGTCCCATGTACGTTCTG
CAGCCTTTTTGCTGCTTCTATCATCTGAAGTTTGTGTAGTACAAATAAGGCCTTTGGG
ATTCTTAATGACATTTATGTTAAAATGTTCTTCTCTTTAAACACCGTTTTCCAATC
CACCTGTCAGGGAGTCCAAATCGTGTCTGTGTTGATGATGCTATACTTTGTAGCTAG
AAAAACAATTTTAGTGTGTTGGGCTCTGTATTCAGACTTCCTTTTTACAAGACCGAT
GGGCAGTGATAGATTATTTTATCATATTTAATGCATGGGAAATAGTGTGCTGAGGAA
GCTATTAAGTATAACTCAGTGAATTGGGTCTGAGTTTTAAATGAGATATTTCAAA
ATTGGCTTGCCACTGTAAAAGCGACTAAATAATAATATGATACTGTTCTTTATGATC
TTGTCATGTTTCACTGATATGTTTGGGGTCTTCACTATGTAAAAAATGTCAAAATTGT
AATGAGCAAGCATGTACAAGTAGTCGTAATCAAAGTTTTTAAACAGGACTGCATT
TTCAATTAGGAAAAGCTGTTTGGCAGATAGCATCCAATGCAAAAACAGAAATATCG
TAACGTTCTGCTTAGTGGGCAAGATAAGATAGGAAAGACATGCTCAAAGAGGCAAA
AGAATCATTGCTATCATTCTACACTAGTTTGAAGAAGTTTTTGTACATCAGAG
CACTTCCTTCAGCACACTTTTTTGCCTTCAGATTTCATTTTTTATAAAAATGAGAAGAC
TAATGATAAACTGTAGAAATCAAAATTTATTGAGAAATCTGTTTCTCCTAACAGATA
GTAACCCTGCCATGATACTACTTCAACAATGTTATAAAAATTTATGTGATAATATA
CATTTTAACCTGGGATTTCTAAATTGCTTTAACAAATGCTAATCCTGAGAGTTGCCCT
GCAGGACTCAAAGGGAAAGGTTTTGGGACGTGGCAGAACCCTGCAGGGACATGG

AATTAAGGCCATTGCAATGTATCATCTTTGTAGCATTGTCATCACTCCTAAGCTGCCT
TCACAGTTTTAGTACACTAAGATGAGGAAATCGAAAATGGGCAGAGAAAGCTCATA
CTGTATAATTGAAGACAGTGACAGAGAACGTGTCAGTTATGCCAAAACCTTTTTGAT
TTCTGTTCCAGGATTTCCAACAAGAGGGGAAAGGAATGACTTGGGAGGGTGGGAAA
GACATTAGGAGTTGTTTTTATTTTTTACCTTGGAAGCTTTAGCTACCAATCCAGTACC
CTCCTAACTAGAATGTATACACATCAGCAGGACTGACTGACTACTTCATTAGAGATA
TACTGTACTCATTGGGGGCCTTGGGGGTACTGCTGTTCTTATGTGGGATTTTAATGTT
GTAATGTATTGCATCTTAATGTATTGAATTCATTTTGTGTACTATATTGGTTGGCAT
TTTATTAATAAATAAATTGTATTGTATCATATTTGTATGTTTTAAGAGAAAATAATAA
AATACAATATTTGTA CTATTATATAGTGCAAAAAC TACAAATCTGTGCCTCTGCCTC
TTGAATTAATTCTTTGGTTGCTTGCATTTGGGAAGGGAATGGAGAAAGGAAAGAAC
CAATAAAGCTTTCAAAGTTCAAGAAA

**[0308] Иллюстративная аминокислотная последовательность предшественника
изоформы 2 VEGFR-1 человека (также известной как sVEGFR-1) (SEQ ID NO: 29)**

MVSYWDTGVLLCALLSCLLLTGSSSGSKLKDPELSLKGTQHIMQAGQTLHLQCRGEAA
HKWSLPPEMVSKESERLSITKSACGRNGKQFCSTLTLNTAQANHTGFYSCKYLAVPTSKK
KETESAIYIFISDTGRPFVEMYSEIPEIHMTEGRELVIPCRVTSFNITVTLKKFPLDTLIPDG
KRIIWDSRKGFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVQISTPRPVKLL
RGHTLVLNCTATTPLNTRVQMTWSYPDEKNKRASVRRRIDQNSHANIFYSVLTIDKMQ
NKDKGLYTCRVRSGPSFKSVNTSVHIYDKAFITVKHRKQQVLETVAGKRSYRLSMKVK
AFPSPEVVWLKDGLPATEKSARYLTRGYSLIKDVTEDAGNYTILLSIKQSNVFNLT
TLIVNVKPKQIYEKAVSSFPDPALYPLGSRQILTCTAYGIPQPTIKWFWHPCNHNHSEARC
DFCSNNEESFILDADSNMGNRIESITQRMAIIEGKNKMASTLVVADSRISGIYICIASNKVG
TVGRNISFYITDVPNGFHVNLKMPTEGEDLKL SCTVNKFLYRDVTWILLRTVNNRTMH
YSISKQKMAITKEHSITLNLTIMNVSLQDSGTACRARNVYTGEEILQKKEITIRGEHCNK
KAVFSRISKFKSTRNDCTTQSNVKH

[0309] Этот вариант (3) отличается 3'-кодированной областью и 3'-UTR по сравнению с
вариантом 1. Кодированный растворимый белок (изоформа 3) имеет более короткий,
выраженный С-концевой участок и лишен трансмембранной и цитоплазматической
областей изоформы 1.

**[0310] Иллюстративная последовательность кДНК изоформы 3 VEGFR-1
человека (SEQ ID NO: 30)**

ATCGAGGTCCGCGGGAGGCTCGGAGCGCGCCAGGCGGACACTCCTCTCGGCTCCTC

CCCGGCAGCGGCGGCGGCTCGGAGCGGGCTCCGGGGCTCGGGTGCAGCGGCCAGCG
GGCGCCTGGCGGCGAGGATTACCCGGGGAAGTGGTTGTCTCCTGGCTGGAGCCGCG
AGACGGGCGCTCAGGGCGCGGGGCGGCGGCGGAACGAGAGGACGGACTCTGG
CGGCCGGGTCGTTGGCCGCGGGGAGCGCGGGCACCGGGCGAGCAGGCCGCGTCGCG
CTCACCATGGTCAGCTACTGGGACACCGGGGTCCTGCTGTGCGCGCTGCTCAGCTGT
CTGCTTCTCACAGGATCTAGTTCAGGTTCAAATTTAAAGATCCTGAACTGAGTTTA
AAAGGCACCCAGCACATCATGCAAGCAGGCCAGACACTGCATCTCCAATGCAGGGG
GGAAGCAGCCATAAATGGTCTTTGCCTGAAATGGTGAGTAAGGAAAGCGAAAGGC
TGAGCATAACTAAATCTGCCTGTGGAAGAAATGGCAAACAATTCTGCAGTACTTTAA
CCTTGAACACAGCTCAAGCAAACCACACTGGCTTCTACAGCTGCAAATATCTAGCTG
TACCTACTTCAAAGAAGAAGGAAACAGAATCTGCAATCTATATATTTATTAGTGATA
CAGGTAGACCTTTCGTAGAGATGTACAGTGAAATCCCCGAAATTATACACATGACTG
AAGGAAGGGAGCTCGTCATTCCCTGCCGGGTTACGTCACCTAACATCACTGTTACTT
TAAAAAAGTTTCCACTTGACACTTTGATCCCTGATGGAAAACGCATAATCTGGGACA
GTAGAAAGGGCTTCATCATATCAAATGCAACGTACAAAGAAATAGGGCTTCTGACC
TGTGAAGCAACAGTCAATGGGCATTTGTATAAGACAAACTATCTCACACATCGACA
AACCAATACAATCATAGATGTCAAATAAGCACACCACGCCAGTCAAATTA
GAGGCCATACTCTTGTCCTCAATTGTACTGCTACCACTCCCTTGAACACGAGAGTTC
AAATGACCTGGAGTTACCCTGATGAAAAAATAAGAGAGCTTCCGTAAGGCGACGA
ATTGACCAAAGCAATTCCCATGCCAACATATTCTACAGTGTTCTTACTATTGACAAA
ATGCAGAACAAAGACAAAGGACTTTATACTTGTCGTGTAAGGAGTGGACCATCATT
CAAATCTGTTAACACCTCAGTGCATATATATGATAAAGCATTCACTGTGAAACA
TCGAAAACAGCAGGTGCTTGAAACCGTAGCTGGCAAGCGGTCTTACCGGCTCTCTAT
GAAAGTGAAGGCATTTCCCTCGCCGGAAGTTGTATGGTTAAAAGATGGGTTACCTGC
GACTGAGAAATCTGCTCGCTATTTGACTCGTGGCTACTCGTTAATTATCAAGGACGT
AACTGAAGAGGATGCAGGGAATTATACAATCTTGCTGAGCATAAAACAGTCAAATG
TGTTTAAAAACCTCACTGCCACTCTAATTGTCAATGTGAAACCCAGATTTACGAAA
AGGCCGTGTCATCGTTTCCAGACCCGGCTCTCTACCCACTGGGCAGCAGACAAATCC
TGACTTGTACCGCATATGGTATCCCTCAACCTACAATCAAGTGGTTCTGGCACCCCT
GTAACCATAATCATTCCGAAGCAAGGTGTGACTTTTGTTC AATAATGAAGAGTCC
TTATCCTGGATGCTGACAGCAACATGGGAAACAGAATTGAGAGCATCACTCAGCGC
ATGGCAATAATAGAAGGAAAGAATAAGATGGCTAGCACCTTGGTTGTGGCTGACTC
TAGAATTTCTGGAATCTACATTTGCATAGCTTCCAATAAAGTTGGGACTGTGGGAAG
AAACATAAGCTTTTATATCACAGATGTGCCAAATGGGTTTCATGTTA ACTTGGAAAA

AATGCCGACGGAAGGAGAGGACCTGAAACTGTCTTGCACAGTTAACAAGTTCTTAT
ACAGAGACGTTACTTGGATTTTACTGCGGACAGTTAATAACAGAACAATGCACTAC
AGTATTAGCAAGCAAAAAATGGCCATCACTAAGGAGCACTCCATCACTCTTAATCTT
ACCATCATGAATGTTTCCCTGCAAGATTCAGGCACCTATGCCTGCAGAGCCAGGAAT
GTATACACAGGGGAAGAAATCCTCCAGAAGAAAGAAATTACAATCAGAGATCAGG
AAGCACCATACCTCCTGCGAAACCTCAGTGATCACACAGTGGCCATCAGCAGTTCCA
CCACTTTAGACTGTCATGCTAATGGTGTCCCCGAGCCTCAGATCACTTGGTTTAAAA
ACAACCACAAAATACAACAAGAGCCTGAACTGTATACATCAACGTCACCATCGTCA
TCGTCATCATCACCATTGTCATCATCATCATCATCGTCATCATCATCATCATAGC
TATCATCATTATCATCATCATCATCATCATCATAGCTACCATTTATTGAAAATA
TTATGTGTCAACTTCAAAGAACTTATCCTTTAGTTGGAGAGCCAAGACAATCATAAC
AATAACAAATGGCCGGGCATGGTGGCTCACGCCTGTAATCCCAGCACTTTGGGAGG
CCAAGGCAGGTGGATCATTTGAGGTCAGGAGTTCAAGACCAGCCTGACCAAGATGG
TGAAATGCTGTCTCTATTAATAAATAACAAAATTAGCCAGGCATGGTGGCTCATGCCTG
TAATGCCAGCTACTCGGGAGGCTGAGACAGGAGAATCACTTGAACCCAGGAGGCAG
AGGTTGCAGGGAGCCGAGATCGTGTACTGCACTCCAGCCTGGGCAACAAGAGCGAA
ACTCCGTCTCAAAAAACAATAAATAAATAAATAAATAAACAGACAAAATCACTT
TTTATTCTATTAAACTTAACATACATGCATTA

[0311] Иллюстративная последовательность кДНК изоформы 3 VEGFR-1 человека (SEQ ID NO: 31)

MVSYWDTGVLLCALLSCLLLTGSSSGSKLKDPELSLKGTQHIMQAGQTLHLQCRGEAA
HKWSLPPEMVSKESEKERSITKSACGRNGKQFCSTLTLNNTAQANHTGFYSCKYLAVPTSKK
KETESAIYIFISDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDG
KRIIWDSRKGFIIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVQISTPRPVKLL
RGHTLVLNCTATTPLNTRVQMTWSYPDEKNKRASVRRRIDQSNSHANIFYSVLTIDKMQ
NKDKGLYTCRVRSGPSFKSVNTSVHIYDKAFITVKHRKQQVLETVAGKRSYRLSMKVK
AFPSPEVVWLKDGLPATEKSARYLTRGYSLIKDVTEEDAGNYTILLSIKQSNVFNLT
TLIVNVKPKIYEKAVSSFPDPALYPLGSRQILCTAYGIPQPTIKWFWHPCNHNHSEARC
DFCSNNEESFILDADSNMGNRIESITQRMAIIEGKNKMASTLVVADSRISGIYICIASNKVG
TVGRNISFYITDVPNGFHVNLKMPTEGEDLKL SCTVNKFLYRDVTWILLRTVNNRTMH
YSISKQKMAITKEHSITLNLTIMNVSLQDSGTYACRARNVYTGEEILQKKEITIRDQEAPY
LLRNLSDHTVAISSSTTLDCHANGVPEPQITWFKNNHKIQQPELYTSTSPSSSSSSPLSS
SSSSSSSS

[0312] Этот вариант (4) отличается 3'-кодирующей областью и 3'-UTR по сравнению с

вариантом 1. Кодируемый растворимый белок (изоформа 4) имеет более короткий, выраженный С-концевой участок и лишен трансмембранной и цитоплазматической областей изоформы 1.

[0313] Иллюстративная последовательность кДНК изоформы 4 VEGFR-1 человека (SEQ ID NO: 32)

ATCGAGGTCCGCGGGAGGCTCGGAGCGCGCCAGGCGGACACTCCTCTCGGCTCCTC
CCCGGCAGCGGGCGGCTCGGAGCGGGCTCCGGGGCTCGGGTGCAGCGGCCAGCG
GGCGCCTGGCGGCGAGGATTACCCGGGGAAGTGGTTGTCTCCTGGCTGGAGCCGCG
AGACGGGCGCTCAGGGCGCGGGGCCGGCGGCGGCGAACGAGAGGACGGACTCTGG
CGGCCGGGTCGTTGGCCGCGGGGAGCGCGGGCACCGGGCGAGCAGGCCGCGTTCGCG
CTCACCATGGTCAGCTACTGGGACACCGGGGTCTGTGTGCGCGCTGCTCAGCTGT
CTGCTTCTCACAGGATCTAGTTCAGGTTCAAAATTAAGATCCTGAACTGAGTTTA
AAAGGCACCCAGCACATCATGCAAGCAGGCCAGACACTGCATCTCCAATGCAGGGG
GGAAGCAGCCATAAATGGTCTTTGCCTGAAATGGTGAGTAAGGAAAGCGAAAGGC
TGAGCATAACTAAATCTGCCTGTGGAAGAAATGGCAAACAATTCTGCAGTACTTTAA
CCTTGAACACAGCTCAAGCAAACCACTGGCTTCTACAGCTGCAAATATCTAGCTG
TACCTACTTCAAAGAAGAAGGAAACAGAATCTGCAATCTATATATTTATTAGTGATA
CAGGTAGACCTTTCGTAGAGATGTACAGTGAAATCCCCGAAATTATACACATGACTG
AAGGAAGGGAGCTCGTCATTCCCTGCCGGGTACGTCACCTAACATCACTGTTACTT
TAAAAAAGTTTCCACTTGACACTTTGATCCCTGATGGAAAACGCATAATCTGGGACA
GTAGAAAGGGCTTCATCATATCAAATGCAACGTACAAAGAAATAGGGCTTCTGACC
TGTGAAGCAACAGTCAATGGGCATTTGTATAAGACAACTATCTCACACATCGACA
AACCAATACAATCATAGATGTCCAAATAAGCACACCACGCCAGTCAAATTACTTA
GAGGCCATACTCTTGTCTCAATTGTAAGTACTGCTACCACTCCCTTGAACACGAGAGTTC
AAATGACCTGGAGTTACCCTGATGAAAAAATAAGAGAGCTTCCGTAAGGCGACGA
ATTGACCAAAGCAATTCCCATGCCAACATATTCTACAGTGTTCTTACTATTGACAAA
ATGCAGAACAAGACAAAGGACTTTATACTTGTTCGTGTAAGGAGTGGACCATCATT
CAAATCTGTTAACACCTCAGTGCATATATGATAAAGCATTCATCACTGTGAAACA
TCGAAAACAGCAGGTGCTTGAAACCGTAGCTGGCAAGCGGTCTTACCGGCTCTCTAT
GAAAGTGAAGGCATTTCCCTCGCCGGAAGTTGTATGGTTAAAAGATGGGTACCTGC
GACTGAGAAATCTGCTCGCTATTTGACTCGTGGCTACTCGTTAATTATCAAGGACGT
AACTGAAGAGGATGCAGGGAATTATACAATCTTGCTGAGCATAAAACAGTCAAATG
TGTTTAAAACCTCACTGCCACTCTAATTGTCAATGTGAAACCCAGATTTACGAAA
AGGCCGTGTCATCGTTTCCAGACCCGGCTCTCTACCACTGGGCAGCAGACAAATCC

TGACTTGTACCGCATATGGTATCCCTCAACCTACAATCAAGTGGTTCTGGCACCCCT
GTAACCATAATCATTCCGAAGCAAGGTGTGACTTTTGTTC AATAATGAAGAGTCCT
TTATCCTGGATGCTGACAGCAACATGGGAAACAGAATTGAGAGCATCACTCAGCGC
ATGGCAATAATAGAAGGAAAGAATAAGCTTCCACCAGCTAACAGTTCTTTCATGTTG
CCACCTACAAGCTTCTCTTCCAAC TACTTCCATTTCTTCCGTGA

[0314] Иллюстративная последовательность кДНК изоформы 4 VEGFR-1 человека (SEQ ID NO: 33)

MVSYWDTGVLLCALLSCLLLTGSSSGSKLKDPELSLKGTQHIMQAGQTLHLQCRGEAA
HKWSLPPEMVSKESEKERSITKSACGRNGKQFCSTLTLNTAQANHTGFYSCKYLAVPTSKK
KETESAIYIFISDTGRPFVEMYSEIPEIHMTEGRELVIPCRVTSFNITVTLKKFPLDTLIPDG
KRIIWDSSRKGFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVQISTPRPVKLL
RGHTLVLNCTATTPLNTRVQMTWSYPDEKNKRASVRRRIDQNSHANIFYSVLTIDKMQ
NKDKGLYTCRVRSGPSFKSVNTSVHIYDKAFITVKHRKQQVLETVAGKRSYRLSMKVK
AFPSPEVVWLKDGLPATEKSARYLTRGYSLIKDVTEEDAGNYTILLSIKQSNVFNLT
TLIVNVKPQIYEKAVSSFPDPALYPLGSRQILTCTAYGIPQPTIKWFWHPCNHNHSEARC
DFCSNNEESFILDADSNMGNRIESITQRMALIEGKNKLPPANSSFMLPPTSFSNYPHFHLP

[0315] Ген VEGFR-2, обнаруживаемый в хромосомном положении 4q12 человека, кодирует 30 экзон-содержащий член семейства рецепторов фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR) и является одним из двух генов, кодирующих рецепторы VEGF-A. Этот рецептор, известный как рецептор, содержащий домен вставки киназы, является рецепторной тирозинкиназой III типа. Он функционирует как основной медиатор VEGF-A индуцированной эндотелиальной пролиферации, выживания, миграции, тубулярного морфогенеза и прорастания. Передача сигналов и передвижение этого рецептора регулируются множеством факторов, включая Rab GTPase, рецептор пуриновых нуклеотидов P2Y, интегрин альфаVбета3, тирозинфосфатазу T-клеточного белка и т.д.

[0316] Иллюстративная последовательность кДНК VEGFR-2 человека (SEQ ID NO: 34)

ACTGAGTCCCGGGACCCCGGGAGAGCGGTCAATGTGTGGTCGCTGCGTTTCTCTGCG
CTGCGCCGGGCATCACTTGC GCGCCGAGAAAGTCCGTCTGGCAGCCTGGATATCCT
CTCCTACCGGCACCCGAGACGCCCTGCAGCCGCGGTGCGCGCCCGGGCTCCCTAG
CCCTGTGCGCTCAACTGTCCTGCGCTGCGGGGTGCCGCGAGTTCCACCTCCGCGCCT
CCTTCTTAGACAGGCGCTGGGAGAAAGAACCGGCTCCCGAGTTCTGGGCATTTGCGC
CCGGCTCGAGGTGCAGGATGCAGAGCAAGGTGCTGCTGGCCGTCGCCCTGTGGGCTC

TGCGTGGAGACCCGGGCCGCTCTGTGGGTTTGCCTAGTGTTTCTCTTGATCTGCCCA
GGCTCAGCATACAAAAAGACATACTTACAATTAAGGCTAATACAACTCTTCAAATTA
CTTGCAGGGGACAGAGGGACTTGGACTGGCTTTGGCCCAATAATCAGAGTGGCAGT
GAGCAAAGGGTGGAGGTGACTGAGTGCAGCGATGGCCTCTTCTGTAAGACACTCAC
AATTC AAAAGTGATCGGAAATGACACTGGAGCCTACAAGTGCTTCTACCGGGAAA
CTGACTTGGCCTCGGTCATTTATGTCTATGTTCAAGATTACAGATCTCCATTTATTGC
TTCTGTTAGTGACCAACATGGAGTCGTGTACATTACTGAGAACAAAAACAAAACCTGT
GGTGATTCCATGTCTCGGGTCCATTTCAAATCTCAACGTGTCACCTTTGTGCAAGATA
CCCAGAAAAGAGATTTGTTCTGATGGTAACAGAATTTCTGGGACAGCAAGAAGG
GCTTTACTATTCCCAGCTACATGATCAGCTATGCTGGCATGGTCTTCTGTGAAGCAA
AAATTAATGATGAAAGTTACCAGTCTATTATGTACATAGTTGTCGTTGTAGGGTATA
GGATTTATGATGTGGTTCTGAGTCCGTCTCATGGAATTGAACTATCTGTTGGAGAAA
AGCTTGTCTTAAATTGTACAGCAAGAACTGAACTAAATGTGGGGATTGACTTCAACT
GGGAATACCCTTCTTCGAAGCATCAGCATAAGAACTTGTAACCGAGACCTAAAA
ACCCAGTCTGGGAGTGAGATGAAGAAATTTTTGAGCACCTTA ACTATAGATGGTGTA
ACCCGGAGTGACCAAGGATTGTACACCTGTGCAGCATCCAGTGGGCTGATGACCAA
GAAGAACAGCACATTTGTCAGGGTCCATGAAAAACCTTTTGTTGCTTTTGGAAGTGG
CATGGAATCTCTGGTGGAAAGCCACGGTGGGGGAGCGTGTGAGAATCCCTGCGAAGT
ACCTTGGTTACCCACCCCCAGAAATAAAATGGTATAAAAATGGAATACCCCTTGAGT
CCAATCACACAATTAAGCGGGGCATGTA CTGACGATTATGGAAGTGAGTGAAAGA
GACACAGGAAATTACTGTCATCCTTACCAATCCCATTTCAAAGGAGAAGCAGAG
CCATGTGGTCTCTCTGGTTGTGTATGTCCCACCCAGATTGGTGAGAAATCTCTAATC
TCTCCTGTGGATTCTACCAGTACGGCACCACTCAAACGCTGACATGTACGGTCTAT
GCCATTCTCCCCGCATCACATCCACTGGTATTGGCAGTTGGAGGAAGAGTGCGCC
AACGAGCCCAGCCAAGCTGTCTCAGTGACAAACCCATAACCTTGTGAAGAATGGAG
AAGTGTGGAGGACTTCCAGGGAGGAAATAAAATTGAAGTTAATAAAAATCAATTTG
CTCTAATTGAAGGAAAAACAAAACCTGTAAGTACCCTTGTTATCCAAGCGGCAAAT
GTGTCAGCTTTGTACAAATGTGAAGCGGTCAACAAAGTCGGGAGAGGAGAGAGGGT
GATCTCCTTCCACGTGACCAGGGTCTGAAATTACTTTGCAACCTGACATGCAGCC
CACTGAGCAGGAGAGCGTGTCTTTGTGGTGC ACTGCAGACAGATCTACGTTTGAGA
ACCTCACATGGTACAAGCTTGGCCACAGCCTCTGCCAATCCATGTGGGAGAGTTGC
CCACACCTGTTTGCAAGAACTTGGATACTCTTTGGAAATTGAATGCCACCATGTTCT
CTAATAGCACAAATGACATTTTGATCATGGAGCTTAAGAATGCATCCTTGCAGGACC
AAGGAGACTATGTCTGCCTTGCTCAAGACAGGAAGACCAAGAAAAGACATTGCGTG

GTCAGGCAGCTCACAGTCCTAGAGCGTGTGGCACCCACGATCACAGGAAACCTGGA
GAATCAGACGACAAGTATTGGGGAAAGCATCGAAGTCTCATGCACGGCATCTGGGA
ATCCCCCTCCACAGATCATGTGGTTTAAAGATAATGAGACCCTTGTAGAAGACTCAG
GCATTGTATTGAAGGATGGGAACCGGAACCTCACTATCCGCAGAGTGAGGAAGGAG
GACGAAGGCCTCTACACCTGCCAGGCATGCAGTGTTCTTGGCTGTGCAAAAGTGGA
GGCATTTCATAATAGAAGGTGCCAGGAAAAGACGAACTTGGAATCATTATTCT
AGTAGGCACGGCGGTGATTGCCATGTTCTTCTGGCTACTTCTTGTGCATCATCCTACGG
ACCGTTAAGCGGGCCAATGGAGGGGAACTGAAGACAGGCTACTTGTCCATCGTCAT
GGATCCAGATGAACTCCCATTGGATGAACATTGTGAACGACTGCCTTATGATGCCAG
CAAATGGGAATTCCCCAGAGACCGGCTGAAGCTAGGTAAGCCTCTTGGCCGTGGTG
CCTTTGGCCAAGTGATTGAAGCAGATGCCTTTGGAATTGACAAGACAGCAACTTGCA
GGACAGTAGCAGTCAAATGTTGAAAGAAGGAGCAACACACAGTGAGCATCGAGC
TTCATGTCTGAACTCAAGATCCTCATTATATTGGTCACCATCTCAATGTGGTCAAC
CTTCTAGGTGCCTGTACCAAGCCAGGAGGGCCACTCATGGTGATTGTGGAATTCTGC
AAATTTGGAACCTGTCCACTTACCTGAGGAGCAAGAGAAATGAATTTGTCCCCTAC
AAGACCAAAGGGGCACGATTCCGTCAAGGGAAAGACTACGTTGGAGCAATCCCTGT
GGATCTGAAACGGCGCTTGGACAGCATCACAGTAGCCAGAGCTCAGCCAGCTCTG
GATTTGTGGAGGAGAAGTCCCTCAGTGATGTAGAAGAAGAGGAAGCTCCTGAAGAT
CTGTATAAGGACTTCTGACCTTGGAGCATCTCATCTGTTACAGCTTCCAAGTGGCT
AAGGGCATGGAGTTCTTGGCATCGCGAAAGTGTATCCACAGGGACCTGGCGGCACG
AAATATCCTCTTATCGGAGAAGAACGTGGTTAAAATCTGTGACTTTGGCTTGGCCC
GGATATTTATAAAGATCCAGATTATGTCAGAAAAGGAGATGCTCGCCTCCCTTTGAA
ATGGATGGCCCCAGAAACAATTTTTGACAGAGTGTACACAATCCAGAGTGACGTCT
GGTCTTTTGGTGTTTTGCTGTGGGAAATATTTTCCTTAGGTGCTTCTCCATATCCTGG
GGTAAAGATTGATGAAGAATTTGTAGGCGATTGAAAGAAGGAACTAGAATGAGGG
CCCCTGATTATACTACACCAGAAATGTACCAGACCATGCTGGACTGCTGGCACGGG
GAGCCCAGTCAGAGACCCACGTTTTTCAGAGTTGGTGGAACATTTGGGAAATCTCTTG
CAAGCTAATGCTCAGCAGGATGGCAAAGACTACATTGTTCTTCCGATATCAGAGACT
TTGAGCATGGAAGAGGATTCTGGACTCTCTCTGCCTACCTCACCTGTTTCCTGTATGG
AGGAGGAGGAAGTATGTGACCCCAAATTCCATTATGACAACACAGCAGGAATCAGT
CAGTATCTGCAGAACAGTAAGCGAAAGAGCCGGCCTGTGAGTGTA AAAACATTTGA
AGATATCCCGTTAGAAGAACCAGAAGTAAAAGTAATCCCAGATGACAACCAGACGG
ACAGTGGTATGGTTCTTGCCTCAGAAGAGCTGAAAACCTTTGGAAGACAGAACCAA
TTATCTCCATCTTTTGGTGGAATGGTGCCAGCAAAAAGCAGGGAGTCTGTGGCATCT

GAAGGCTCAAACCAGACAAGCGGCTACCAGTCCGGATATCACTCCGATGACACAGA
CACCACCGTGTACTCCAGTGAGGAAGCAGAACTTTTAAAGCTGATAGAGATTGGAG
TGCAAACCGGTAGCACAGCCCAGATTCTCCAGCCTGACTCGGGGACCACTGAGC
TCTCCTCCTGTTTAAAAGGAAGCATCCACACCCCCAACTCCTGGACATCACATGAGA
GGTGCTGCTCAGATTTTCAAGTGTTGTTCTTTCCACCAGCAGGAAGTAGCCGCATTT
GATTTTCATTTGACAACAGAAAAAGGACCTCGGACTGCAGGGAGCCAGTCTTCTA
GGCATATCCTGGAAGAGGCTTGTGACCCAAGAATGTGTCTGTGTCTTCTCCCAGTGT
TGACCTGATCCTCTTTTTTCATTCATTTAAAAAGCATTATCATGCCCCCTGCTGCGGG
TCTCACCATGGGTTTAGAACAAGACGTTCAAGAAATGGCCCCATCCTCAAAGAAG
TAGCAGTACCTGGGGAGCTGACACTTCTGTAAAAGATAAACCAGGCAATG
TAAGTGTTGAGGTGTTGAAGATGGGAAGGATTTGCAGGGCTGAGTCTATCCAAGA
GGCTTTGTTTAGGACGTGGGTCCCAAGCCAAGCCTTAAGTGTGGAATTCGGATTGAT
AGAAAGGAAGACTAACGTTACCTTGCTTTGGAGAGTACTGGAGCCTGCAAATGCAT
TGTGTTTGCTCTGGTGGAGGTGGGCATGGGGTCTGTTCTGAAATGTAAAGGGTTCAG
ACGGGGTTTCTGGTTTTAGAAAGGTGCGTGTTCTTCGAGTTGGGCTAAAGTAGAGTT
CGTTGTGCTGTTTCTGACTCCTAATGAGAGTTCCTTCCAGACCGTTACGTGTCTCCTG
GCCAAGCCCCAGGAAGGAAATGATGCAGCTCTGGCTCCTTGTCTCCCAGGCTGATCC
TTTATTCAGAATACCACAAAGAAAGGACATTCAGCTCAAGGCTCCCTGCCGTGTTGA
AGAGTTCTGACTGCACAAACCAGCTTCTGGTTTCTTCTGGAATGAATACCCTCATAT
CTGTCCTGATGTGATATGTCTGAGACTGAATGCGGGAGGTTCAATGTGAAGCTGTGT
GTGGTGTCAAAGTTTCAGGAAGGATTTTACCCTTTTGTCTTCCCCCTGTCCCCAACC
CACTCTCACCCCGCAACCCATCAGTATTTTAGTTATTTGGCCTCTACTCCAGTAAACC
TGATTGGGTTTGTTCCTCTCTGAATGATTATTAGCCAGACTTCAAAAATTATTTTATA
GCCCAAATTATAACATCTATTGTATTATTTAGACTTTTAAACATATAGAGCTATTTCTA
CTGATTTTTGCCCTTGTTCTGTCTTTTTTTTCAAAAAAGAAAATGTGTTTTTTTGTGG
TACCATAGTGTGAAATGCTGGGAACAATGACTATAAGACATGCTATGGCACATATA
TTTATAGTCTGTTTATGTAGAAACAATGTAATATATTAAGCCTTATATATAATGA
ACTTTGTAATTCACATTTTGTATCAGTATTATGTAGCATAACAAGGTCATAATGC
TTTCAGCAATTGATGTCATTTTATTAAGAACATTGAAAAAAGCTTGAAAAA
AAAAAA

[0317] Иллюстративная аминокислотная последовательность предшественника VEGFR-2 человека (SEQ ID NO: 35)

MQSKVLLAVALWLCVETRAASVGLPSVSLDLPRLSIQKDILTIKANTTLQITCRGQRDL
WLWPNNQSGSEQRVEVTECDGLFCKLTIPKVIKNDTGAYKCFYRETDLASVIYVYVQ

DYRSPFIASVSDQHGVVYITENKNKTVVIPCLGSISNLNVSLCARYPEKRFVPDGNRISW
DSKKGFTIPSYMISYAGMVFCEAKINDESYQSIMYIVVVVGYRIYDVVLSPSHGIELSVGE
KLVNCTARTELVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTR
SDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKPFVAFSGMESLVEATVGERVRIPAKYLG
PPPEIKWYKNGIPLESNHTIKAGHVLTIMEVSERDTGNYTVILTNPISKEKQSHVVSLVVY
VPPQIGEKSLISPVDSYQYGTQTTLCTVYAIPPPHHIHWYWQLEEECANEPSQAVSVTN
PYPCEEWRSEDFQGGNKIEVNKNQFALIEGKNKTVSTLVIQAANVSALYKCEAVNKV
GRGERVISFHVTRGPEITLQPDMQPTEQESVSLWCTADRSTFENLTWYKLGPPQPLPIHVG
ELPTPVCKNLDTLWKLNATMFSNSTNDILIMELKNASLQDQGDYVCLAQDRKTKKRHC
VVRQLTVLERVAPTITGNLENQTTSIGESIEVSCITASGNPPPQIMWFKDNETLVEDSGIVL
KDGNRNLTIRRVKEDEGLYTCQACSVLGC AKVEAFFIIEGAQEKTNLEIILVGTAVIAM
FFWLLLVIILRTVKRANGGELKTGYLSIVMDPDELPLDEHCERLPYDASKWEFPRDRLKL
GKPLGRGAFGQVIEADAFGIDKTATCRTVAVKMLKEGATHSEHRALMSELKILIHIGHH
LNVVNLGACTKPGGPLMVIVEFCKFGNLSTYLRSKRNEFVPYKTKGARFRQGKD YVG
AIPVDLKRRLDSITSSQSSASSGFVEEKSLSDVEEEEAPEDLYKDFLTLEHLICYSFQVAK
GMEFLASRKCIHRDLAARNILLSEKNVVKICDFGLARDIYKDPDYVRKGDARLPLKWM
APETIFDRVYTIQSDVWSFGVLLWEIFSLGASPYPGVKIDEEFCRRLKEGTRMRAPDYTT
PEMYQTMLDCWHGEPSSQRPTFSELVEHLGNLLQANAQQDGKDYIVLPISETLSMEEDSG
LSLPTSPVSCMEEEEVCDPKFHVDNTAGISQYLQNSKRKSRPVSVKTFEDIPLEEPEVKVI
PDDNQTDSGMVLASEELKTLEDRTKLSPSFGGMVPSKSRESVASEGSNQTSQYQSGYHS
DDTDTTVYSSEEAEELLKLEIGVQTGSTAQILQPDSGTTLSPPV

[0318] Ген VEGFR-3, обнаруживаемый в хромосомном положении 5q35.3 человека, кодирует 35 экзон, содержащий член семейства рецепторов фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR). Этот ген кодирует тирозинкиназный рецептор для факторов роста эндотелия сосудов C и D. Считается, что этот белок участвует в лимфангиогенезе и поддержании лимфатического эндотелия.

[0319] Иллюстративная последовательность кДНК изоформы 1 VEGFR-3 человека (SEQ ID NO: 36)

ACTTTCAGCCCCGAGCCGCGGCCGCTCGGGTCGGACCCACGCGCAGCGGCCGGAGA
TGCAGCGGGGCGCCGCGCTGTGCCTGCGACTGTGGCTCTGCCTGGGACTCCTGGACG
GCCTGGTGAGTGGCTACTCCATGACCCCCCGACCTTGAACATCACGGAGGAGTCAC
ACGTCATCGACACCGGTGACAGCCTGTCCATCTCCTGCAGGGGACAGCACCCCCTCG
AGTGGGCTTGGCCAGGAGCTCAGGAGGCGCCAGCCACCGGAGACAAGGACAGCGA
GGACACGGGGGTGGTGCGAGACTGCGAGGGGCACAGACGCCAGGCCCTACTGCAAG

GTGTTGCTGCTGCACGAGGTACATGCCAACGACACAGGCAGCTACGTCTGCTACTAC
AAGTACATCAAGGCACGCATCGAGGGCACACGGCCGCCAGCTCCTACGTGTTTCGT
GAGAGACTTTGAGCAGCCATTCATCAACAAGCCTGACACGCTCTTGGTCAACAGGA
AGGACGCCATGTGGGTGCCCTGTCTGGTGTCCATCCCCGGCCTCAATGTCACGCTGC
GCTCGCAAAGCTCGGTGCTGTGGCCAGACGGGCAGGAGGTGGTGTGGGATGACCGG
CGGGGCATGCTCGTGTCCACGCCACTGCTGCACGATGCCCTGTACCTGCAGTGCGAG
ACCACCTGGGGAGACCAGGACTTCCCTTTCCAACCCCTTCCCTGGTGCACATCACAGGC
AACGAGCTCTATGACATCCAGCTGTTGCCAGGAAGTCGCTGGAGCTGCTGGTAGG
GGAGAAGCTGGTCCTGAACTGCACCGTGTGGGCTGAGTTAACTCAGGTGTCACCTT
TGA CTGGGACTACCCAGGGAAGCAGGCAGAGCGGGGTAAGTGGGTGCCCGAGCGA
CGCTCCAGCAGACCCACACAGA ACTCTCCAGCATCCTGACCATCCACAACGTCAGC
CAGCACGACCTGGGCTCGTATGTGTGCAAGGCCAACACGGCATCCAGCGATTTTCG
GGAGAGCACCGAGGTCATTGTGCATGAAAATCCCTTCATCAGCGTCGAGTGGCTCA
AAGGACCCATCCTGGAGGCCACGGCAGGAGACGAGCTGGTGAAGCTGCCCGTGAAG
CTGGCAGCGTACCCCCCGCCCGAGTTCCAGTGGTACAAGGATGGAAAGGCACTGTC
CGGGCGCCACAGTCCACATGCCCTGGTGCTCAAGGAGGTGACAGAGGCCAGCACAG
GCACCTACACCCTCGCCCTGTGGA ACTCCGCTGCTGGCCTGAGGCGCAACATCAGCC
TGGAGCTGGTGGTGAATGTGCCCCCAGATA CATGAGAAGGAGGCCTCCTCCCC
AGCATCTACTCGCGTCACAGCCGCCAGGCCCTCACCTGCACGGCCTACGGGGTGCCC
CTGCCTCTCAGCATCCAGTGGCACTGGCGGCCCTGGACACCCTGCAAGATGTTTGCC
CAGCGTAGTCTCCGGCGGCGGCAGCAGCAAGACCTCATGCCACAGTGCCGTGACTG
GAGGGCGGTGACCACGCAGGATGCCGTGAACCCCATCGAGAGCCTGGACACCTGGA
CCGAGTTTGTGGAGGGAAAGAATAAGACTGTGAGCAAGCTGGTGTATCCAGAATGCC
AACGTGTCTGCCATGTACAAGTGTGTGGTCTCCAACAAGGTGGGCCAGGATGAGCG
GCTCATCTACTTCTATGTGACCACCATCCCCGACGGCTTCACCATCGAATCCAAGCC
ATCCGAGGAGCTACTAGAGGGCCAGCCGGTGCTCCTGAGCTGCCAAGCCGACAGCT
ACAAGTACGAGCATCTGCGCTGGTACCGCCTCAACCTGTCCACGCTGCACGATGCGC
ACGGGAACCCGCTTCTGCTCGACTGCAAGAACGTGCATCTGTTTCGCCACCCCTCTGG
CCGCCAGCCTGGAGGAGGTGGCACCTGGGGCGCGCCACGCCACGCTCAGCCTGAGT
ATCCCCCGCGTCGCGCCCCGAGCACGAGGGCCACTATGTGTGCGAAGTGCAAGACCG
GCGCAGCCATGACAAGCACTGCCACAAGAAGTACCTGTTCGGTGCAGGCCCTGGAAG
CCCCTCGGCTCACGCAGAACTTGACCGACCTCCTGGTGAACGTGAGCGACTCGCTGG
AGATGCAGTGCTTGGTGGCCGGAGCGCACGCGCCAGCATCGTGTGGTACAAAGAC
GAGAGGCTGCTGGAGGAAAAGTCTGGAGTCGACTTGGCGGACTCCAACCAGAAGCT

GAGCATCCAGCGCGTGCGCGAGGAGGATGCGGGACGCTATCTGTGCAGCGTGTGCA
ACGCCAAGGGCTGCGTCAACTCCTCCGCCAGCGTGGCCGTGGAAGGCTCCGAGGAT
AAGGGCAGCATGGAGATCGTGATCCTTGTCTGGTACCGGCGTCATCGCTGTCTTCTTC
TGGGTCCTCCTCCTCCTCATCTTCTGTAACATGAGGAGGCCGGCCCACGCAGACATC
AAGACGGGCTACCTGTCCATCATCATGGACCCCGGGGAGGTGCCTCTGGAGGAGCA
ATGCGAATACCTGTCTACGATGCCAGCCAGTGGGAATCCCCGAGAGCGGCTGC
ACCTGGGGAGAGTGCTCGGCTACGGCGCCTTCGGGAAGGTGGTGGGAAGCCTCCGCT
TTCGGCATCCACAAGGGCAGCAGCTGTGACACCGTGGCCGTGAAAATGCTGAAAGA
GGGCGCCACGGCCAGCGAGCACCGCGCGCTGATGTCTGGAGCTCAAGATCCTCATTC
ACATCGGCAACCACCTCAACGTGGTCAACCTCCTCGGGGCGTGCACCAAGCCGCAG
GGCCCCCTCATGGTGTGATCGTGGAGTTCTGCAAGTACGGCAACCTCTCCAACCTCCTG
CGCGCCAAGCGGGACGCCTTCAGCCCCTGCGCGGAGAAGTCTCCCGAGCAGCGCGG
ACGCTTCCGCGCCATGGTGGAGCTCGCCAGGCTGGATCGGAGGCGGCCGGGGAGCA
GCGACAGGGTCTCTTCGCGCGGTTCTCGAAGACCGAGGGCGGAGCGAGGCGGGCT
TCTCCAGACCAAGAAGCTGAGGACCTGTGGCTGAGCCCGCTGACCATGGAAGATCT
TGTCTGCTACAGCTTCCAGGTGGCCAGAGGGATGGAGTTCCTGGCTTCCCGAAAGTG
CATCCACAGAGACCTGGCTGCTCGGAACATTCTGCTGTCTGGAAAGCGACGTGGTGA
AGATCTGTGACTTTGGCCTTGCCCCGGGACATCTACAAAGACCCCGACTACGTCCGCA
AGGGCAGTGCCCCGGCTGCCCCTGAAGTGGATGGCCCCCTGAAAGCATCTTCGACAAG
GTGTACACCACGCAGAGTGACGTGTGGTCCTTTGGGGTGCTTCTCTGGGAGATCTTC
TCTCTGGGGGCTCCCCGTACCCTGGGGTGCAGATCAATGAGGAGTTCTGCCAGCGG
CTGAGAGACGGCACAAGGATGAGGGCCCCGGAGCTGGCCACTCCCGCCATACGCCG
CATCATGCTGAACTGCTGGTCCGGAGACCCCAAGGCGAGACCTGCATTCTCGGAGCT
GGTGGAGATCCTGGGGGACCTGCTCCAGGGCAGGGGCCTGCAAGAGGAAGAGGAG
GTCTGCATGGCCCCGCGCAGCTCTCAGAGCTCAGAAGAGGGCAGCTTCTCGCAGGT
GTCCACCATGGCCCTACACATCGCCCAGGCTGACGCTGAGGACAGCCCGCCAAGCC
TGCAGCGCCACAGCCTGGCCGCCAGGTATTACAACCTGGGTGTCTTTCCCGGGTGCC
TGCCAGAGGGGCTGAGACCCGTGGTTCCTCCAGGATGAAGACATTTGAGGAATTC
CCCATGACCCCAACGACCTACAAAGGCTCTGTGGACAACCAGACAGACAGTGGGAT
GGTGTCTGGCCTCGGAGGAGTTTGAGCAGATAGAGAGCAGGCATAGACAAGAAAGC
GGCTTCAGCTGTAAAGGACCTGGCCAGAATGTGGCTGTGACCAGGGCACACCCTGA
CTCCCAAGGGAGGCGGCGGGCCTGAGCGGGGGGCCCGAGGAGGCCAGGTGTTTT
ACAACAGCGAGTATGGGGAGCTGTCTGGAGCCAAGCGAGGAGGACCACTGCTCCCCG
TCTGCCCGCGTGACTTTCTTCACAGACAACAGCTACTAAGCAGCATCGGACAAGACC

CCCAGCACTTGGGGGTTTCAGGCCCGGCAGGGCGGGCAGAGGGGCTGGAGGCCAGGC
TGGGAACATCATCTGGTTGAACTCTGGTGGCACAGGAGTGTCTCTTCCCTCTCTGCA
GACTTCCCAGCTAGGAAGAGCAGGACTCCAGGCCCAAGGCTCCCGGAATTCGGTCA
CCACGACTGGCCAGGGCCACGCTCCAGCTGCCCGGCCCTCCCCCTGAGATTCAGA
TGTCATTTAGTTCAGCATCCGCAGGTGCTGGTCCCGGGGCCAGCACTTCCATGGGAA
TGTCTCTTTGGCGACCTCCTTTCATCACACTGGGTGGTGGCCTGGTCCCTGTTTTCCC
ACGAGGAATCTGTGGGTCTGGGAGTCACACAGTGTGGAGGTTAAGGCATACGAGA
GCAGAGGTCTCCCAAACGCCCTTTCCTCCTCAGGCACACAGCTACTCTCCCCACGAG
GGCTGGCTGGCCTCACCCACCCCTGCACAGTTGAAGGGAGGGGCTGTGTTTCCATCT
CAAAGAAGGCATTTGCAGGGTCTCTTCTGGGCCTGACCAAACAGCCAACTAGCCC
CTGGGGTGGCCACCAGTATGACAGTATTATACGCTGGCAACACAGAGGCAGCCCGC
ACACCTGCGCCTGGGTGTTGAGAGCCATCCTGCAAGTCTTTTTCAACAGAACTTAC
AGACTGTTAGAGCTGCTGAGAAGAATTTGCTTTCCGAATTCAGCCTGGAAGGCGCCC
AGGGACAGCTGTACTGAGTCTAGATGACTCTGACCCCCGCCCCAGGTCAAGGCCAG
CAGAGCAGTCAGTGCCTCTGGAGAAGGCCCTTGCTCTCCACCTGGCCCAGACTCCG
AGGAGCCTGGGTCTGGAGCTGCCGGTCTGGTTCTTCCCTTTAGAGCCCGGATCTGCC
ACCTGCGGCCCTCCCAAGCCGTGAACCAGCTCATGAGAGATGAACACTGTGGGAT
CCACTCAGGAAGGCTCGGGGCTGGCACAAAGGACCACCCAGCATTGCCCTGTGCCA
CCCAGCACTCAGTGGACATTCTGGGGACCTGCCTTCAGCCTTTTCTGCCCTGTGCCT
GACATCAGCACCCCTGGCTGGTCAGAATGCCGCCCTCCCAGAGGAGCAGCCGAGAGA
TCCCCTGAAGGCTGGAGGCATTCTGCTCAGGACCCCTATCCCAGCTCACAGTGCCCA
ACCATCTCACCAGGAGAAAGAGCCACATCCCCACGTTAGGACCACGGAGACTGACC
ACCACCCTGACCCCCCAAACCCACGCACCAGACGCTTGCAGGACAGGGCGCCGCGCA
GCGGGCAGGGGCTTGCCCGGCCGACCCTCCCCTCCCCACCTCCCCACTGCGCGTTA
CTCCAGGATATGCCGAGTGCACGTATAAGGTCATCTTCGTCGTCGCCCGTGGACCTCC
CCCTTCTCTGCACGTCGTCCAACGTGGGACTGGCGTGTGTCAGGCTTCCCTGGGAGGA
TCTGGAGGTTGTTCTCTGCAGAGAACCAGCCTGGCTCCTGGCGCGCACCTCTGCTCC
CTTCTCCTCACTACCCACCCACGCATGTACCGGGAAAAAACTACTATGCCCTTCTA
GACCATGTTCTGAGAAAAGATCGAAAATATTTAACAAGAGATAATAATAAATCTGA
TGCCGGTCTTTGTGTGTGTTGCGGA

**[0320] Иллюстративная аминокислотная последовательность предшественника
изоформы 1 VEGFR-3 человека (SEQ ID NO: 37)**

MQRGAALCLRLWLCLGLLDGLVSGYSMTPTLNITEESHVIDTGDSLISICRGQHPLEW
AWPGAQEAPATGDKDSED TG VVRDCEGTDARPYCKVLLLHEVHANDTGSYVCYYKYI

KARIEGTTAASSYVFVRDFEQPFINKPDTLLVNRKDAMWVPCLVSIPGLNVTLSQSSVL
WPDGQEVVWDDRRGMLVSTPLLHDALYLQCETTWGDQDFLSNPFLVHITGNELYDIQL
LPRKSLELLVGEKLVLNCTVWAEFNSGVTFDWDYPGKQAERGKWVPERRSQQTHTELS
SILTIHNVSQHDLGSYVCKANNGIQRFRESTEIVIVHENPFISVEWLKGPILEATAGDELVK
LPVKLAAAYPPPEFQWYKDGKALSGRHSPHALVLKEVTEASTGTYTLALWNSAAGLRRN
ISLELVVNVPPQIHEKEASSPSIYSRHSRQALCTAYGVPLPLSIQWHWRPWTPCKMFAQ
RSLRRRQQQDLMPQCRDWRAVTTQDAVNPIESLDTWTEFVEGKNKTVSKLVIQNANVS
AMYKCVVSNKVGQDERLIYFYVTTIPDGFTIESKPSSEELLEGQPVLLSCQADSYPKYEHLR
WYRLNLSTLHDAHGNPLLLDCKNVHLFATPLAASLEEVAPGARHATLSLSIPRVAPEHE
GHYVCEVQDRRSHDKHCHKKYL SVQALEAPRLTQNLTDLLVNVSDSLEMQCLVAGAH
APSIVWYKDERLLEEKSGVDLADSNQKLSIQRVREEDAGRYLCSVCNAKGCVNSSASV
AVEGSEDKGSMEIVILVGTGVIAVFFWVLLLLIFCNMRRPAHADIKTGYSIIMDPGEVPL
EEQCEYLSYDASQWEFPRERLHLGRVLGYGAFGKVVEASAFGIHKGSSCDTVAVKMLK
EGATASEHRALMSELKILIHIGNHLNVVNLLGACTKPQGPLMVIVEFCKYGNLSNFLRA
KRDAFSPCAEKSPQRGRFRAMVELARLDRRRPGSSDRVLFARFSKTEGGARRASPDQE
AEDLWLSPLTMEDLVCYSFQVARGMEFLASRKCIHRDLAARNILLESADVVKICDFGLA
RDIYKDPDYVRKGSARLPLKWMAPESIFDKVYTTQSDVWSFGVLLWEIFSLGASPYPGV
QINEEFCQRLRDGTRMRAPELATPAIRRIMLNCWSGDPKARPAFSELVEILGDLLQGRGL
QEEEEVCMAPRSSQSSEEGSFSQVSTMALHIAQADAEDSPPSLQRHSLAARYYNWVSFP
GCLARGAETRGSSRMKTFEEFPMPTTTYKGSVDNQTDSGMVLASEEFEQIESRHRQESG
FSCKGPGQNVAVTRAHPDSQGRRRRPERGARGGQVFYNSEYGELSEPSEEDHCSPSARV
TFFTDNSY

[0321] Этот вариант (2) содержит альтернативный 3'-концевой экзон по сравнению с вариантом 1. В результате изоформа (2) имеет более короткий С-концевой участок по сравнению с изоформой 1.

[0322] **Иллюстративная последовательность кДНК изоформы 2 VEGFR-3 человека (SEQ ID NO: 38)**

ACTTTCAGCCCCGAGCCGCGGCCGCTCGGGTCGGACCCACGCGCAGCGGCCGGAGA
TGCAGCGGGGCGCCGCGCTGTGCCTGCGACTGTGGCTCTGCCTGGGACTCCTGGACG
GCCTGGTGAGTGGCTACTCCATGACCCCCCGACCTTGAACATCACGGAGGAGTCAC
ACGTCATCGACACCGGTGACAGCCTGTCCATCTCCTGCAGGGGACAGCACCCCCTCG
AGTGGGCTTGGCCAGGAGCTCAGGAGGCGCCAGCCACCGGAGACAAGGACAGCGA
GGACACGGGGGTGGTGCGAGACTGCGAGGGCACAGACGCCAGGCCCTACTGCAAG
GTGTTGCTGCTGCACGAGGTACATGCCAACGACACAGGCAGCTACGTCTGCTACTAC

AAGTACATCAAGGCACGCATCGAGGGCACACGGCCGCCAGCTCCTACGTGTTTCGT
GAGAGACTTTGAGCAGCCATTCATCAACAAGCCTGACACGCTCTTGGTCAACAGGA
AGGACGCCATGTGGGTGCCCTGTCTGGTGTCCATCCCCGGCCTCAATGTCACGCTGC
GCTCGCAAAGCTCGGTGCTGTGGCCAGACGGGCAGGAGGTGGTGTGGGATGACCGG
CGGGGCATGCTCGTGTCCACGCCACTGCTGCACGATGCCCTGTACCTGCAGTGCGAG
ACCACCTGGGGAGACCAGGACTTCCTTTCCAACCCCTTCCTGGTGCACATCACAGGC
AACGAGCTCTATGACATCCAGCTGTTGCCAGGAAGTCGCTGGAGCTGCTGGTAGG
GGAGAAGCTGGTCCTGAACTGCACCGTGTGGGCTGAGTTTAACTCAGGTGTCACCTT
TGACTGGGACTACCCAGGGAAGCAGGCAGAGCGGGGTAAGTGGGTGCCCGAGCGA
CGCTCCCAGCAGACCCACACAGA ACTCTCCAGCATCCTGACCATCCACAACGTCAGC
CAGCACGACCTGGGCTCGTATGTGTGCAAGGCCAACAACGGCATCCAGCGATTTCC
GGAGAGCACCGAGGTCATTGTGCATGAAAATCCCTTCATCAGCGTCGAGTGGCTCA
AAGGACCCATCCTGGAGGCCACGGCAGGAGACGAGCTGGTGAAGCTGCCCGTGAAG
CTGGCAGCGTACCCCCCGCCGAGTTCCAGTGGTACAAGGATGGAAAGGCACTGTC
CGGGCGCCACAGTCCACATGCCCTGGTGTCAAGGAGGTGACAGAGGCCAGCACAG
GCACCTACACCCTCGCCCTGTGGA ACTCCGCTGCTGGCCTGAGGCGCAACATCAGCC
TGGAGCTGGTGGTGAATGTGCCCCCCCAGATACATGAGAAGGAGGCCTCCTCCCC
AGCATCTACTCGCGTCACAGCCGCCAGGCCCTCACCTGCACGGCCTACGGGGTGCCC
CTGCCTCTCAGCATCCAGTGGCACTGGCGGCCCTGGACACCCTGCAAGATGTTTGCC
CAGCGTAGTCTCCGGCGGCGGCAGCAGCAAGACCTCATGCCACAGTGCCGTGACTG
GAGGGCGGTGACCACGCAGGATGCCGTGAACCCCATCGAGAGCCTGGACACCTGGA
CCGAGTTTGTGGAGGGAAAGAATAAGACTGTGAGCAAGCTGGTGTATCCAGAATGCC
AACGTGTCTGCCATGTACAAGTGTGTGGTCTCCAACAAGGTGGGCCAGGATGAGCG
GCTCATCTACTTCTATGTGACCACCATCCCCGACGGCTTCACCATCGAATCCAAGCC
ATCCGAGGAGCTACTAGAGGGCCAGCCGGTGTCTCTGAGCTGCCAAGCCGACAGCT
ACAAGTACGAGCATCTGCGCTGGTACCGCCTCAACCTGTCCACGCTGCACGATGCGC
ACGGGAACCCGCTTCTGCTCGACTGCAAGAACGTGCATCTGTTCCGCCACCCCTCTGG
CCGCCAGCCTGGAGGAGGTGGCACCTGGGGCGCGCCACGCCACGCTCAGCCTGAGT
ATCCCCCGCGTCGCGCCCAGCACGAGGGCCACTATGTGTGCGAAGTGCAAGACCG
GCGCAGCCATGACAAGCACTGCCACAAGAAGTACCTGTCCGGTGCAGGCCCTGGAAG
CCCCTCGGCTCACGCAGAACTTGACCGACCTCCTGGTGAACGTGAGCGACTCGCTGG
AGATGCAGTGCTTGGTGGCCGGAGCGCACGCGCCCAGCATCGTGTGGTACAAAGAC
GAGAGGCTGCTGGAGGAAAAGTCTGGAGTCGACTTGGCGGACTCCAACCAGAAGCT
GAGCATCCAGCGCGTGC GCGAGGAGGATGCGGGACGCTATCTGTGCAGCGTGTGCA

ACGCCAAGGGCTGCGTCAACTCCTCCGCCAGCGTGGCCGTGGAAGGCTCCGAGGAT
AAGGGCAGCATGGAGATCGTGATCCTTGTCTGGTACCGGCGTCATCGCTGTCTTCTTC
TGGGTCTCCTCCTCCTCATCTTCTGTAACATGAGGAGGCCGGCCCACGCAGACATC
AAGACGGGCTACCTGTCCATCATCATGGACCCCGGGGAGGTGCCTCTGGAGGAGCA
ATGCGAATACCTGTCCTACGATGCCAGCCAGTGGGAATTCCCCCGAGAGCGGCTGC
ACCTGGGGAGAGTGCTCGGCTACGGCGCCTTCGGGAAGGTGGTGGGAAGCCTCCGCT
TTCGGCATCCACAAGGGCAGCAGCTGTGACACCGTGGCCGTGAAAATGCTGAAAGA
GGGCGCCACGGCCAGCGAGCACCGCGCGCTGATGTCTGGAGCTCAAGATCCTCATTC
ACATCGGCAACCACCTCAACGTGGTCAACCTCCTCGGGGCGTGCACCAAGCCGCAG
GGCCCCCTCATGGTGTGATCGTGGAGTTCTGCAAGTACGGCAACCTCTCCAACCTCCTG
CGCGCCAAGCGGGACGCCTTCAGCCCCTGCGCGGAGAAGTCTCCCGAGCAGCGCGG
ACGCTTCCGCGCCATGGTGGAGCTCGCCAGGCTGGATCGGAGGCCGGCCGGGGAGCA
GCGACAGGGTCTCTTCGCGCGGTTCTCGAAGACCGAGGGCGGAGCGAGGCGGGCT
TCTCCAGACCAAGAAGCTGAGGACCTGTGGCTGAGCCCCTGACCATGGAAGATCT
TGTCTGCTACAGCTTCCAGGTGGCCAGAGGGATGGAGTTCCTGGCTTCCCGAAAGTG
CATCCACAGAGACCTGGCTGCTCGGAACATTCTGCTGTCTCGGAAAGCGACGTGGTGA
AGATCTGTGACTTTGGCCTTGCCCGGGACATCTACAAAGACCCCGACTACGTCCGCA
AGGGCAGTGCCCGGCTGCCCTGAAGTGGATGGCCCCTGAAAGCATCTTCGACAAG
GTGTACACCACGCAGAGTGACGTGTGGTCTTTGGGGTGCTTCTCTGGGAGATCTTC
TCTCTGGGGGCTCCCCGTACCCTGGGGTGCAGATCAATGAGGAGTTCTGCCAGCGG
CTGAGAGACGGCACAAGGATGAGGGCCCCGGAGCTGGCCACTCCCGCCATACGCCG
CATCATGCTGAACTGCTGGTCCGGAGACCCCAAGGCGAGACCTGCATTCTCGGAGCT
GGTGGAGATCCTGGGGGACCTGCTCCAGGGCAGGGGCCTGCAAGAGGAAGAGGAG
GTCTGCATGGCCCCGCGCAGCTCTCAGAGCTCAGAAGAGGGCAGCTTCTCGCAGGT
GTCCACCATGGCCCTACACATCGCCCAGGCTGACGCTGAGGACAGCCCGCCAAGCC
TGCAGCGCCACAGCCTGGCCGCCAGGTATTACAACCTGGGTGTCTTTCCCGGGTGCC
TGCCAGAGGGGCTGAGACCCGTGGTTCCTCCAGGATGAAGACATTTGAGGAATTC
CCCATGACCCCAACGACCTACAAAGGCTCTGTGGACAACCAGACAGACAGTGGGAT
GGTGTCTGGCCTCGGAGGAGTTTGAGCAGATAGAGAGCAGGCATAGACAAGAAAGC
GGCTTCAGGTAGCTGAAGCAGAGAGAGAGAAGGCAGCATAACGTCAGCATTTTCTTC
TCTGCACTTATAAGAAAGATCAAAGACTTTAAGACTTTCGCTATTTCTTCTACTGCTA
TCTACTACAACTTCAAAGAGGAACCAGGAGGACAAGAGGAGCATGAAAGTGGAC
AAGGAGTGTGACCACTGAAGCACACAGGGAGGGGTTAGGCCTCCGGATGACTGCG
GGCAGGCCTGGATAATATCCAGCCTCCACAAGAAGCTGGTGGAGCAGAGTGTTCC

CTGACTCCTCCAAGGAAAGGGAGACGCCCTTTCATGGTCTGCTGAGTAACAGGTGCC
TTCCCAGACACTGGCGTACTGCTTGACCAAAGAGCCCTCAAGCGGCCCTTATGCCA
GCGTGACAGAGGGCTCACCTCTTGCCCTTCTAGGTCACCTTCTCACAATGTCCCTTCAG
CACCTGACCCTGTGCCACCAGTTATTCCTTGGTAATATGAGTAATACATCAAAGAG
TAGTATTAAGCTAATTAATCATGTTTATACTAA

**[0323] Иллюстративная аминокислотная последовательность предшественника
изоформы 1 VEGFR-3 человека (SEQ ID NO: 39)**

MQRGAALCLRLWLCLGLLDGLVSGYSMTPTLNITEESHVIDTGDSLISCRGQHPLEW
AWPGAQEAPATGDKDSED TG VVRDCEGTDARPYCKVLLLHEVHANDTGSYVCYYKYI
KARIEGTTAASSYVFVRDFEQPFINKPDTLLVNRKDAMWVPCLVSIPGLNVTLSQSSVL
WPDGQEVVWDDRRGMLVSTPLLHDALYLQCETTWGDQDFLSNPFVHITGNELYDIQL
LPRKSLELLVGEKLVLNCTVWAEFNSGVTFDWDYPGKQAERGKWWPERRSQQTHTELS
SILTIHNVSQHDLGSYVCKANNGIQRFRETEVIVHENPFISVEWLKGPIL EATAGDELVK
LPVKLAA YPPPEFQWYKDGKALSGRHS PHALVLKEVTEASTGTYTLALWNSAAGLRRN
ISLELVVNVPPQIHEKEASSPSIYSRHSRQAL TCTAYGVPLPLSIQWHWRPWTPCKMFAQ
RSLRRRQQQDLMPQCRDWRAVTTQDAVNPIESLDTWTEFVEGKNKTVSKLVIQANANVS
AMYKCVVSNKVGQDERLIYFYVTTIPDGFTIESKPS EELLEGGQP VLLSCQADSYKYEHLR
WYRLNLSTLHDAHGNPLLLDCKNVHLFATPLAASLEEVAPGARHATLSLSIPRVAPEHE
GHYVCEVQDRRSHDKHCHKKYL SVQALEAPRLTQNLTDLLVNVSDSLEMQCLVAGAH
APSIVWYKDERLLEEKSGVDLADSNQKLSIQRVREEDAGRYLCSVCNAKGCVNSSASV
AVEGSEDKGSMEIVILVGTGVIAVFFWVLLLLIFCNMRRPAHADIKTYLSIIMDPGEVPL
EEQCEYLSYDASQWEFPRERLHLGRVLGYGAFGKVVEASAFGIHKGSSCDTVAVKMLK
EGATASEHRALMSELKILIHGNHLNVNLLGACTKPQGPLMVIVEFCKYGNLSNFLRA
KRDAFSPCAEKSP EQRGRFRAMVELARLDRRRPGSSDRVLFARFSKTEGGARRASPDQE
AEDLWLSPLTMEDLVCYSFQVARGMEFLASRKC IHRDLAARNILLES DVVKICDFGLA
RDIYKDPDYVRKGSARLPLKWMAPESIFDKVYTTQSDVWSFGVLLWEIFSLGASPYPGV
QINEEFCQRLRDGTRMRAPELATPAIRRIMLNCWSGDPKARPAFSELVEILGDLLQGRGL
QEEEEVCMAPRSSQSSEEGSFSQVSTMALHIAQADAEDSPPSLQRHSLAARYYNWVSFP
GCLARGAETRGSSRMKTFEEFPMPTTTYKGSVDNQTDSGMVLASEE FEQIESRHRQESG
FR

[0324] Данный вариант (3) содержит альтернативный 3'-концевой экзон по сравнению с вариантом 1. В результате изоформа (3) имеет более короткий С-концевой участок по сравнению с изоформой 1.

[0325] Иллюстративная последовательность кДНК изоформы 2 VEGFR-3 человека (SEQ ID NO: 40)

ACTTTCAGCCCCGAGCCGCGGCCGCTCGGGTCGGACCCACGCGCAGCGGCCGGAGA
TGCAGCGGGGCGCCGCGCTGTGCCTGCGACTGTGGCTCTGCCTGGGACTCCTGGACG
GCCTGGTGAGTGGCTACTCCATGACCCCCCGACCTTGAACATCACGGAGGAGTCAC
ACGTCATCGACACCGGTGACAGCCTGTCCATCTCCTGCAGGGGACAGCACCCCCTCG
AGTGGGCTTGGCCAGGAGCTCAGGAGGCGCCAGCCACCGGAGACAAGGACAGCGA
GGACACGGGGGTGGTGCAGACTGCGAGGGCACAGACGCCAGGCCCTACTGCAAG
GTGTTGCTGCTGCACGAGGTACATGCCAACGACACAGGCAGCTACGTCTGCTACTAC
AAGTACATCAAGGCACGCATCGAGGGCACCCACGGCCGCCAGCTCCTACGTGTTTCGT
GAGAGACTTTGAGCAGCCATTCATCAACAAGCCTGACACGCTCTTGGTCAACAGGA
AGGACGCCATGTGGGTGCCCTGTCTGGTGTCCATCCCCGGCCTCAATGTCACGCTGC
GCTCGCAAAGCTCGGTGCTGTGGCCAGACGGGCAGGAGGTGGTGTGGGATGACCGG
CGGGGCATGCTCGTGTCCACGCCACTGCTGCACGATGCCCTGTACCTGCAGTGCGAG
ACCACCTGGGGAGACCAGGACTTCCTTTCCAACCCCTTCCTGGTGCACATCACAGGC
AACGAGCTCTATGACATCCAGCTGTTGCCAGGAAGTCGCTGGAGCTGCTGGTAGG
GGAGAAGCTGGTCCTGAACTGCACCGTGTGGGCTGAGTTTAACTCAGGTGTCACCTT
TGA CTGGGACTACCCAGGGAAGCAGGCAGAGCGGGGTAAGTGGGTGCCCGAGCGA
CGCTCCCAGCAGACCCACACAGAACTCTCCAGCATCCTGACCATCCACAACGTCAGC
CAGCACGACCTGGGCTCGTATGTGTGCAAGGCCAACACGGCATCCAGCGATTTTCG
GGAGAGCACCGAGGTCATTGTGCATGAAAATCCCTTCATCAGCGTCGAGTGGCTCA
AAGGACCCATCCTGGAGGCCACGGCAGGAGACGAGCTGGTGAAGCTGCCC GTGAAG
CTGGCAGCGTACCCCCGCCCAGTTCCAGTGGTACAAGGATGGAAAGGCACTGTC
CGGGCGCCACAGTCCACATGCCCTGGTGTCAAGGAGGTGACAGAGGCCAGCACAG
GCACCTACACCCTCGCCCTGTGGA ACTCCGCTGCTGGCCTGAGGCGCAACATCAGCC
TGGAGCTGGTGGTGAATGTGCCCCCAGATACATGAGAAGGAGGCCTCCTCCCC
AGCATCTACTCGCGTCACAGCCGCCAGGCCCTCACCTGCACGGCCTACGGGGTGCCC
CTGCCTCTCAGCATCCAGTGGCACTGGCGGCCCTGGACACCCTGCAAGATGTTTGCC
CAGCGTAGTCTCCGGCGGCGGCAGCAGCAAGACCTCATGCCACAGTGCCGTGACTG
GAGGGCGGTGACCACGCAGGATGCCGTGAACCCCATCGAGAGCCTGGACACCTGGA
CCGAGTTTGTGGAGGGAAAGAATAAGACTGTGAGCAAGCTGGT GATCCAGAATGCC
AACGTGTCTGCCATGTACAAGTGTGTGGTCTCCAACAAGGTGGGCCAGGATGAGCG
GCTCATCTACTTCTATGTGACCACCATCCCCGACGGCTTCACCATCGAATCCAAGCC
ATCCGAGGAGCTACTAGAGGGCCAGCCGGTGTCTCCTGAGCTGCCAAGCCGACAGCT

ACAAGTACGAGCATCTGCGCTGGTACCGCCTCAACCTGTCCACGCTGCACGATGCGC
ACGGGAACCCGCTTCTGCTCGACTGCAAGAACGTGCATCTGTTCCGCCACCCCTCTGG
CCGCCAGCCTGGAGGAGGTGGCACCTGGGGCGCGCCACGCCACGCTCAGCCTGAGT
ATCCCCCGCGTCGCGCCCAGCACGAGGGCCACTATGTGTGCGAAGTGCAAGACCG
GCGCAGCCATGACAAGCACTGCCACAAGAAGTACCTGTCCGGTGCAGGCCCTGGAAG
CCCCTCGGCTCACGCAGAACTTGACCGACCTCCTGGTGAACGTGAGCGACTCGCTGG
AGATGCAGTGCTTGGTGGCCGGAGCGCACGCGCCCAGCATCGTGTGGTACAAAGAC
GAGAGGCTGCTGGAGGAAAAGTCTGGAGTCGACTTGGCGGACTCCAACCAGAAGCT
GAGCATCCAGCGCGTGC GCGAGGAGGATGCGGGACGCTATCTGTGCAGCGTGTGCA
ACGCCAAGGGCTGCGTCAACTCCTCCGCCAGCGTGGCCGTGGAAGGCTCCGAGGAT
AAGGGCAGCATGGAGATCGTGATCCTTGTCCGGTACCGGCGTCATCGCTGTCTTCTTC
TGGGTCCCTCCTCCTCATCTTCTGTAACATGAGGAGGCCGGCCACGCAGACATC
AAGACGGGCTACCTGTCCATCATCATGGACCCCGGGGAGGTGCCTCTGGAGGAGCA
ATGCGAATACCTGTCCACGATGCCAGCCAGTGGGAATTCCCCCGAGAGCGGCTGC
ACCTGGGGAGAGTGCTCGGCTACGGCGCCTTCGGGAAGGTGGTGGAAAGCCTCCGCT
TTCGGCATCCACAAGGGCAGCAGCTGTGACACCGTGGCCGTGAAAATGCTGAAAGA
GGGCGCCACGGCCAGCGAGCACCGCGCGCTGATGTCCGGAGCTCAAGATCCTCATTC
ACATCGGCAACCACCTCAACGTGGTCAACCTCCTCGGGCGTGCACCAAGCCGCAG
GGCCCCCTCATGGTGTGATCGTGGAGTTCTGCAAGTACGGCAACCTCTCCAACCTCCTG
CGCGCCAAGCGGGACGCCTTCAGCCCCTGCGCGGAGAAGTCTCCCGAGCAGCGCGG
ACGCTTCCGCGCCATGGTGGAGCTCGCCAGGCTGGATCGGAGGCCGGCCGGGGAGCA
GCGACAGGGTCTCTTCGCGCGGTTCTCGAAGACCGAGGGCGGAGCGAGGCCGGGCT
TCTCCAGACCAAGAAGCTGAGGACCTGTGGCTGAGCCCGCTGACCATGGAAGATCT
TGTCTGCTACAGCTTCCAGGTGGCCAGAGGGATGGAGTTCCTGGCTTCCCGAAAGTG
CATCCACAGAGACCTGGCTGCTCGGAACATTCTGCTGTCGGAAAGCGACGTGGTGA
AGATCTGTGACTTTGGCCTTGCCCGGGACATCTACAAAGACCCCGACTACGTCCGCA
AGGGCAGTGCCCGGCTGCCCTGAAGTGGATGGCCCTGAAAGCATCTTCGACAAG
GTGTACACCACGCAGAGTGACGTGTGGTCCTTTGGGGTGCTTCTCTGGGAGATCTTC
TCTCTGGGGGCCTCCCCGTACCCTGGGGTGCAGATCAATGAGGAGTTCTGCCAGCGG
CTGAGAGACGGCACAAGGATGAGGGCCCCGGAGCTGGCCACTCCCGCCATACGCCG
CATCATGCTGAACTGCTGGTCCGGAGACCCCAAGGCGAGACCTGCATTCTCGGAGCT
GGTGGAGATCCTGGGGGACCTGCTCCAGGGCAGGGGCCTGCAAGAGGAAGAGGAG
GTCTGCATGGCCCCGCGCAGCTCTCAGAGCTCAGAAGAGGGCAGCTTCTCGCAGGT
GTCCACCATGGCCCTACACATCGCCCAGGCTGACGCTGAGGACAGCCCGCCAAGCC

TGCAGCGCCACAGCCTGGCCGCCAGGTATTACAACCTGGGTGTCCTTTCCCGGGTGCC
TGGCCAGAGGGGCTGAGACCCGTGGTTCCTCCAGGATGAAGACATTTGAGGAATTC
CCCATGACCCCAACGACCTACAAAGGCTCTGTGGACAACCAGACAGACAGTGGGAT
GGTGCTGGCCTCGGAGGAGTTTGAGCAGATAGAGAGCAGGCATAGACAAGAAAGC
GGCTTCAGAGGAACCAGGAGGACAAGAGGAGCATGAAAGTGGACAAGGAGTGTGA
CCACTGAAGCACACAGGGAGGGGTTAGGCCTCCGGATGACTGCGGGCAGGCCTGG
ATAATATCCAGCCTCCCACAAGAAGCTGGTGGAGCAGAGTGTTCCCTGACTCCTCCA
AGGAAAGGGAGACGCCCTTTCATGGTCTGCTGAGTAACAGGTGCCTTCCCAGACAC
TGGCGTTACTGCTTGACCAAAGAGCCCTCAAGCGGCCCTTATGCCAGCGTGACAGA
GGGCTCACCTCTTGCCTTCTAGGTCACCTTCTACAATGTCCCTTCAGCACCTGACCT
GTGCCACCAGTTATTCCTTGGTAATATGAGTAATACATCAAAGAGTAGTATTA
GCTAATTAATCATGTTTATACTAA

**[0326] Иллюстративная аминокислотная последовательность предшественника
изоформы 1 VEGFR-3 человека (SEQ ID NO: 41)**

MQRGAALCLRLWLCLGLLDGLVSGYSMTPTLNITEESHVIDTGDSLISCRGQHPLEW
AWPGAQEAPATGDKDSED TG VVRDCEGTDARPYCKVLLLHEVHANDTGSYVCYYKYI
KARIEGTTAASSYVVRDFEQPFINKPDTLLVNRKDAMWVPCLVSIPGLNVTLSQSSVL
WPDGQEVVWDDRRGMLVSTPLLHDALYLQCETTWGDQDFLSNPFLVHITGNELYDIQL
LPRKSLELLVGEKLVLNCTVWAEFNSGVTFDWDYPGKQAERGKWWPERRSQQTHTELS
SILTIHNVSQHDLGSYVCKANNGIQRFRETEVIVHENPFISVEWLKGPIL EATAGDELVK
LPVKLAAYPPPEFQWYKDGKALSGRHSPHALVLKEVTEASTGTYTLALWNSAAGLRRN
ISLELVVNVPPQIHEKEASSPSIYSRHSRQAL TCTAYGVPLPLSIQWHWRPWTPCKMFAQ
RSLRRRQQQDLMPQCRDWRAVTTQDAVNPIESLDTWTEFVEGKNKTVSKLVIQANVNS
AMYKCVVSNKVGQDERLIYFYVTTIPDGF TIESKPS EELLEGPVLLSCQADSYKYEHLR
WYRLNLSTLHDAHGNPLLLDCKNVHLFATPLAASLEEVAPGARHATLSLSIPRVAPEHE
GHYVCEVQDRRSHDKHCHKKYL SVQALEAPRLTQNLTDLLVNVSDSLEMQCLVAGAH
APSIVWYKDERLLEEKSGVDLADSNQKLSIQRVREEDAGRYLCSVCNAKGCVNSSASV
AVEGSEDKGSMEIVILVGTGVIAVFFWVLLLLIFCNMRRPAHADIKTYLSIIMDPGEVPL
EEQCEYLSYDASQWEFPRERLHLGRVLGYGAFGKVVEASAFGIHKGSSCDTVAVKMLK
EGATASEHRALMSELKILIHIGNHLNVVNLLGACTKPQGPLMVIVEFCKYGNLSNFLRA
KRDAFSPCAEK SPEQRGRFRAMVELARLDRRRPGSSDRVLFARFSKTEGGARRASPDQE
AEDLWLSPLTMEDLVCYSFQVARGMEFLASRKC IHRDLAARNILLES DVVKICDFGLA
RDIYKDPDYVRKGSARLPLKWMAPESIFDKVYTTQSDVWSFGVLLWEIFSLGASYPYGV
QINEEFCQRLRDGTRMRAPELATPAIRRIMLNCWSGDPKARPAFSELVEILGDLLQGRGL

QEEEEVCMAPRSSQSSEEGSFSQVSTMALHIAQADAEDSPPSLQRHSLAARYYNWVSFP
GCLARGAETRGSSRMKTFEEFPMPTTTYKGSVDNQTDSGMVLASEEFEQIESRHRQESG
FRGTRRTRGA

Слитые белки

[0327] Слитые белки или химерные белки представляют собой белки, созданные путем соединения двух или более генов, которые первоначально кодировали отдельные белки. Трансляция слитого гена приводит к образованию одного или нескольких полипептидов с функциональными свойствами, полученными от каждого из исходных белков. Рекомбинантные слитые белки создаются искусственно, и получаемые белки могут иметь в качестве основы полипептиды с различными функциями и/или физико-химическими характеристиками. В некоторых вариантах осуществления композиции анти-VEGF белков, описанные в данном документе, включают слияния одного или более белков VEGF-R или их характерных частей, как описано в данном документе.

[0328] Например, слитые белки антител могут объединять антитело, нацеленное на специфический антиген, с белком, способным изменять иммунный ответ или вызывать прямое повреждение раковой клетки. Например, цитолитические слитые белки повышают способность антител уничтожать раковые клетки, присоединяя их к токсину. Эти так называемые «иммунотоксины» получают свою силу от токсина и свою специфичность от антитела или фрагмента антитела, к которому они присоединены. В некоторых вариантах осуществления такие слитые белки могут включать полипептид (например, антитело и/или его характерный фрагмент), слитый с цитокином, для создания «иммуноцитокинов». Такой слитый белок может объединять антитело, нацеленное на опухоль (например, антитело к VEGF), с цитокином (медиатором врожденного иммунного ответа). В некоторых вариантах осуществления это усиливает локальную активацию иммунной системы в микроокружении опухоли, потенциально способствуя уничтожению раковой клетки и/или опухоли (например, ВШ).

[0329] В определенных вариантах осуществления любой из описанных в данном документе анти-VEGF белков (например, антитело, растворимый рецептор VEGF и/или его характерная VEGF-связывающая часть) может содержать одну или более (например, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять) аминокислотных замен в области Fc, которые уменьшают период полужизни антитела и/или растворимого рецептора VEGF у млекопитающего, например, по сравнению с периодом полужизни идентичного антитела и/или растворимого рецептора VEGF, не содержащего по меньшей мере одну из одной или

более аминокислотных замен. Способы определения периода полужизни антитела и/или растворимого рецептора VEGF у млекопитающего хорошо известны в данной области техники. Неограничивающие примеры точечных мутаций Fc, которые могут уменьшать период полужизни антитела, и/или растворимого рецептора VEGF, описаны в Leabman et al., *MAbs* 5(6):896-903, 2013; которая полностью включена в данный документ посредством ссылки.

Афлиберцепт

[0330] В определенных вариантах осуществления анти-VEGF белок, описанный в данном документе, представляет собой афлиберцепт. Афлиберцепт представляет собой рекомбинантный слитый белок, состоящий из частей внеклеточных доменов 1 и 2 рецепторов VEGF человека, слитых с частью Fc IgG1 человека. Афлиберцепт представляет собой димерный гликопротеин с молекулярной массой белка приблизительно 97 килодальтонов (кДа) и может содержать посттрансляционное гликозилирование, которое может составлять дополнительные 15% от общей молекулярной массы, в результате чего общая молекулярная масса составляет 115 кДа. Афлиберцепт одобрен FDA и показан для лечения неоваскулярной (влажной) возрастной макулярной дегенерации, макулярного отека после окклюзии вен сетчатки, диабетического макулярного отека, метастатического колоректального рака и диабетической ретинопатии.

[0331] В определенных вариантах осуществления афлиберцепт функционирует как VEGF-TRAP. В отличие от определенных иллюстративных стратегий связывания VEGF на основе антител, описанных в данном документе, например, с применением ранибизумаба и/или бевацизумаба, в некоторых вариантах осуществления VEGF-TRAP включает второй связывающий домен рецептора VEGFR-1 и третий домен рецептора VEGFR-2. Путем слияния этих внеклеточных белковых последовательностей с сегментом Fc остова IgG человека образуется химерный белок с очень высокой аффинностью связывания VEGF ($K_d \approx 1$ пМ). Как ранибизумаб и бевацизумаб, VEGF-TRAP, такой как афлиберцепт, связывает все изомеры семейства VEGF-A, а также связывает VEGF-B и плацентарный фактор роста. В определенных вариантах осуществления белок афлиберцепт конъюгирован с подходящей сигнальной последовательностью секреции, такой как IL2SS (описана ниже). В определенных вариантах осуществления белковый продукт VEGF-TRAP представлен SEQ ID NO: 43 или 44.

[0332] Иллюстративная нуклеотидная кодирующая последовательность афлиберцепта (SEQ ID NO: 42)

ATGTACCGGATGCAGCTGCTGAGCTGTATCGCCCTGTCTCTGGCCCTGGTCACCAAT
TCTAGCGATACCGGCAGACCCTTCGTGGAAATGTACAGCGAGATCCCCGAGATCAT
CCACATGACCGAGGGCAGAGAGCTGGTCATCCCCTGCAGAGTGACAAGCCCCAACA
TCACCGTGACTCTGAAGAAGTTCCCTCTGGACACACTGATCCCCGACGGCAAGAGA
ATCATCTGGGACAGCCGGAAGGGCTTCATCATCAGCAACGCCACCTACAAAGAGAT
CGGCCTGCTGACCTGTGAAGCCACCGTGAATGGCCACCTGTACAAGACCAACTACCT
GACACACAGACAGACCAACACCATCATCGACGTGGTGCTGAGCCCTAGCCACGGCA
TTGAACTGTCTGTGGGCGAGAAGCTGGTGCTGAACTGTACCGCCAGAACCGAGCTG
AACGTGGGCATCGACTTCAACTGGGAGTACCCAGCAGCAAGCACCAGCACAAGAA
ACTGGTCAACCGGGACCTGAAAACCCAGAGCGGCAGCGAGATGAAGAAATTCCTGA
GCACCCTGACCATCGACGGCGTGACCAGATCTGACCAGGGCCTGTACACATGTGCC
GCCAGCTCTGGCCTGATGACCAAGAAAAACAGCACCTTCGTGCGGGTGCACGAGAA
GGACAAGACCCACACCTGTCCTCCATGTCCTGCTCCAGAACTGCTCGGCGGACCTTC
CGTGTTCCTGTTTCCTCCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCCTGA
AGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCACGAGGATCCCGAAGTGAAGTTCAATT
GGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACA
GTACAATAGCACCTACAGAGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGATTGGCT
GAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCTCCTATCG
AGAAAACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACCCAGGTTTACACACTG
CCTCCAAGCAGGGACGAGCTGACAAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTCAA
GGGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAATGGCCAGCCTGAGA
ACAACTACAAGACAACCCCTCCTGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTTCCTGTACA
GCAAGCTGACAGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTTCAGCTGCAGC
GTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGTCTCCT
GGA

[0333] Иллюстративная аминокислотная последовательность афлиберцепта (SEQ ID NO: 43)

MYRMQLLSIALSLALVTNSSDTGRPFVEMYSEIPEIИHMTEGRELVIPCRVTSFNITVTLK
KFPLDTLIPDGKRIIWDNRKGFISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQNTIIDV
VLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEM
KKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKDKTHTCPPCPAPPELLGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK

SRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[0334] Иллюстративная аминокислотная последовательность внеклеточного (EC) домена афлиберцепта (SEQ ID NO: 112)

MYRMQLLSICIALSLALVTNSSDTGRPFVEMYSEIPEIИHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLK
KFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDV
VLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEM
KKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK

[0335] Иллюстративная аминокислотная последовательность афлиберцепта (SEQ ID NO: 44)

SDTGRPFVEMYSEIPEIИHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKG
FIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNC
TARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLY
TCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKAKAGQPPEPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP
SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPG

[0336] Иллюстративная нуклеотидная последовательность фрагмента, поддающаяся кристаллизации (Fc) (SEQ ID NO: 110)

GACAAGACCCACACCTGTCCATGTCCGCTCCAGAACTGCTCGGCGGACCTTCC
GTGTTCCCTGTTTCCCTCCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCCTGAA
GTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCCACGAGGATCCCGAAGTGAAGTTCAATTG
GTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAG
TACAACAGCACCTACAGAGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGATTGGCTG
AACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCTCCTATCGA
GAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACCCAGGTTTACACACTGC
CTCCAAGCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTCGTGAAG
GGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAATGGCCAGCCAGAGAA
CAACTACAAGACAACCCCTCCTGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTTCTGTACAG
CAAGCTGACAGTGGACAAGTCCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTTCAGCTGCAGCG
TGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCTCTGAGCCTGTCTCCTG
GC

[0337] Иллюстративная аминокислотная последовательность фрагмента, поддающаяся кристаллизации (Fc) (SEQ ID NO: 111)

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV
DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Конструкции

[0338] Помимо прочего, в настоящем изобретении предусмотрено, что некоторые полинуклеотиды, описанные в данном документе, представляют собой полинуклеотидные конструкции. Полинуклеотидные конструкции в соответствии с настоящим изобретением включают все известные в данной области техники, включая космиды, плазмиды (например, голые или содержащиеся в липосомах) и вирусные конструкции (например, лентивирусные, ретровирусные, аденовирусные и аденоассоциированные вирусные конструкции), которые включают полинуклеотид, включающий анти-VEGF белок, например, антитело к VEGF, и/или растворимый рецептор VEGF (например, анти-VEGF-TRAP белок (например, слитый белок, такой как афлиберцепт)). Специалисты в данной области смогут выбрать подходящие конструкции, а также клетки для получения любого из описанных в данном документе полинуклеотидов. В некоторых вариантах конструкция представляет собой плазмиду (например, молекулу кольцевой ДНК, которая может автономно реплицироваться внутри клетки). В некоторых вариантах осуществления конструкция может представлять собой космиду (например, серию pWE или sCos).

[0339] В некоторых вариантах осуществления конструкция представляет собой вирусную конструкцию. В некоторых вариантах осуществления вирусная конструкция представляет собой лентивирусную, ретровирусную, аденовирусную или аденоассоциированную вирусную конструкцию. В некоторых вариантах осуществления конструкция представляет собой аденоассоциированную вирусную (AAV) конструкцию (см., например, Asokan et al., Mol. Ther. 20: 699-7080, 2012, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки). Упрощенный пример генома AAV ДТ представлен на **фиг. 5, панель (А)**, а упрощенный пример конструкции рекомбинантного AAV (rAAV) представлен на **фиг. 5, панель (В)**. В некоторых вариантах осуществления вирусная конструкция представляет собой аденовирусную конструкцию. В некоторых вариантах осуществления вирусная конструкция также может быть основана на альфавирусе или получена из него. Альфавирусы включают вирус Синдбис (и VEEV), вирус Аура, вирус

Бабанки, вирус леса Барма, вирус Бебару, вирус Кабассу, вирус Чикунгунья, вирус восточного лошадиного энцефалита, вирус Эверглейдс, вирус Форт-Морган, вирус Гета, вирус Хайлендс J, вирус Кызылагач, вирус Майаро, вирус Ме Три, вирус Мидделбурга, вирус Mosso das Pedras, вирус Мукамбо, вирус Ндумо, вирус Вирус О'ньонг-ньонг, вирус Пиксуна, вирус Рио-Негро, вирус Росс-Ривер, вирус болезни поджелудочной железы лосося, вирус леса Семлики, вирус южного морского слона, вирус Тонате, вирус Трокара, вирус Уна, вирус венесуэльского энцефалита лошадей, вирус западного энцефалита лошадей и вирус Ватароа. Как правило, геном таких вирусов кодирует неструктурные (например, репликон) и структурные белки (например, капсид и оболочечный белок), которые могут транслироваться в цитоплазме клетки-хозяина. Вирус Росс-Ривер, вирус Синдбис, вирус леса Семлики (SFV) и вирус венесуэльского энцефалита лошадей (VEEV) были использованы для разработки вирусных конструкций для доставки кодирующей последовательности. Псевдотипированные вирусы могут быть образованы путем объединения альфавирусных оболочечных гликопротеинов и ретровирусных капсидов. Примеры альфавирусных конструкций можно найти в публикациях США № 20 150 050 243, 20 090 305 344 и 20 060 177 819; конструкции и способы их получения полностью включены в данный документ посредством ссылки.

[0340] Представленные в данном документе конструкции могут быть разных размеров. В некоторых вариантах осуществления конструкция представляет собой плазмиду и может иметь общую длину до около 1 т.п.н., до около 2 т.п.н., до около 3 т.п.н., до около 4 т.п.н., до около 5 т.п.н., до около 6 т.п.н., до около 7 т.п.н., до около 8 т.п.н., до около 9 т.п.н., до около 10 т.п.н., до около 11 т.п.н., до около 12 т.п.н., до около 13 т.п.н., до около 14 т.п.н. или до около 15 т.п.н. В некоторых вариантах осуществления конструкция представляет собой плазмиду и может иметь общую длину в диапазоне от около 1 т.п.н. до около 2 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 3 т.п.н., от около 1 т.п.н. до примерно 4 т.п.н., примерно от 1 т.п.н. около 5 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 6 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 7 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 8 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 9 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 10 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 11 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 12 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 13 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 14 т.п.н. или от около 1 т.п.н. до около 15 т.п.н.

[0341] В некоторых вариантах осуществления конструкция представляет собой вирусную конструкцию и может иметь общее количество нуклеотидов до 10 т.п.н. В некоторых вариантах осуществления вирусная конструкция может иметь общее количество нуклеотидов в диапазоне от около 1 т.п.н. до около 2 т.п.н., от 1 т.п.н. до около 3 т.п.н., от

количество нуклеотидов в диапазоне от около 1 т.п.н. до около 2 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 3 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 4 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 5 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 6 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 7 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 8 т.п.н., от около 2 т.п.н. до около 3 т.п.н., от около 2 т.п.н. до около 4 т.п.н., от около 2 т.п.н. до около 5 т.п.н., от около 2 т.п.н. до около 6 т.п.н., от около 2 т.п.н. до около 7 т.п.н., от около 2 т.п.н. до около 8 т.п.н., от около 3 т.п.н. до около 4 т.п.н., от около 3 т.п.н. до около 5 т.п.н., от около 3 т.п.н. до около 6 т.п.н., от около 3 т.п.н. до около 7 т.п.н., от около 3 т.п.н. до около 8 т.п.н., от около 4 т.п.н. до около 5 т.п.н., от около 4 т.п.н. до около 6 т.п.н., от около 4 т.п.н. до около 7 т.п.н., от около 4 т.п.н. до около 8 т.п.н., от около 5 т.п.н. до около 6 т.п.н., от около 5 т.п.н. до около 7 т.п.н., от около 5 т.п.н. до около 8 т.п.н., от около 6 т.п.н. до около 7 т.п.н., от около 6 т.п.н. до около 8 т.п.н. или от около 7 т.п.н. до около 8 т.п.н.

[0344] Любая из описанных в данном документе конструкций может дополнительно включать контрольную последовательность, например, контрольную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательности инициации транскрипции, последовательности терминации транскрипции, последовательности промотора, последовательности энхансера, последовательности сплайсинга РНК, последовательности полиаденилирования (поли (А)), консенсусной последовательности Козак и/или дополнительных нетранслируемых областей, которые могут содержать пре- или посттранскрипционные регуляторные и/или контрольные элементы. В некоторых вариантах осуществления промотор может представлять собой нативный промотор, конститутивный промотор, индуцибельный промотор и/или тканеспецифичный промотор. Неограничивающие примеры контрольных последовательностей описаны в данном документе.

Частицы AAV

[0345] Среди прочего, в настоящем изобретении предложены частицы AAV, которые содержат капсид AAV, описанный в данном документе, содержащий рекомбинантную конструкцию AAV (rAAV), кодирующую анти-VEGF белок, например, антитело к VEGF и/или анти-VEGF-TRAP белок. В некоторых вариантах осуществления частицы AAV могут быть описаны как имеющие серотип, который представляет собой описание штамма конструкции и капсидного штамма. Например, в некоторых вариантах осуществления частица AAV может быть описана как AAV2, причем частица имеет капсид AAV2 и конструкцию, которая содержит характерные инвертированные концевые повторы (ITR) AAV2. В некоторых вариантах осуществления частица AAV может быть описана как псевдотип, в котором капсид и конструкция получены из разных штаммов AAV, например,

AAV2/9 будет относиться к частице AAV, которая содержит конструкцию, в которой используется ITR AAV2 и капсид AAV9. Эта же номенклатура может быть использована для капсидов, конструкций и/или частиц гAAV.

[0346] В определенных вариантах осуществления генная терапия с использованием частиц гAAV является многообещающим методом лечения заболеваний внутреннего уха по нескольким причинам, таким как: (1) внутреннее ухо, которое содержит слуховой и вестибулярный сенсорный эпителий, имеет модифицированный иммунный надзор, аналогичный таковому в центральной нервной системе (Fujioka 2014, полностью включено в данный документ посредством ссылки); (2) сенсорные и поддерживающие клетки улиткового кортиевого органа являются постмитотическими, что допускает возможность длительной экспрессии после однократного введения гAAV; и (3) совокупный клинический опыт доставки гAAV как взрослым, так и детям несколькими путями введения предполагает сильный профиль безопасности для гAAV в качестве средства доставки, особенно при локализованной доставке и/или в низких и умеренных дозах.

[0347] Проведение клинических испытаний с использованием частиц гAAV началось более двух десятилетий тому назад, и частицы гAAV были введены сотням участников в десятках клинических испытаний в дозах до приблизительно 1×10^{15} вг или более для системного введения (см., например, Flotte 1996; Flotte 2013; Parente 2018 и Wang 2019, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки). Количество испытаний, в которых частицы гAAV использовались для переноса генов *in vivo*, постоянно растет. Профиль безопасности вместе с высокой эффективностью трансдукции широкого спектра тканей-мишеней сделал частицы гAAV предпочтительной платформой для генной терапии *in vivo* (Wang 2019, полностью включена в данный документ посредством ссылки). Успешное применение технологии гAAV было достигнуто в клинике для лечения различных состояниях, включая нарушения свертывания крови, наследственную слепоту и нейродегенеративные заболевания (см., например, Colella 2018; и Wang 2019, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки).

[0348] В определенных вариантах осуществления композиции, содержащие частицу гAAV, содержащую конструкции, кодирующие анти-VEGF белок, называются гAAV-анти-VEGF. В определенных композициях, в которых используется капсид Anc80, такая композиция может называться гAAVAnc80-анти-VEGF. В некоторых вариантах осуществления эти композиции также могут называться АК-анти-VEGF. В некоторых вариантах осуществления частица гAAVAnc80-анти-VEGF содержит конкретную

конструкцию гAAV, например, она может содержать конструкцию, представленную на **фиг. 6, панель (А)**. Такая конструкция упоминается в данном документе как конструкция V_H/V_L , и/или гAAVAnc80- V_H/V_L ; иллюстративная конструкция гAAVAnc80- V_H/V_L кодирует ранибизумаб. В некоторых вариантах осуществления частица гAAVAnc80-анти-VEGF содержит конструкцию, представленную на **фиг. 6, панель (В)**, причем конструкция может называться конструкцией антитела GFP (ABGFP) и/или гAAVAnc80-ABGFP; иллюстративная конструкция гAAVAnc80-ABGFP кодирует ранибизумаб или бевацизумаб, транскрипционно связанный с GFP. В некоторых вариантах осуществления конструкция гAAVAnc80-анти-VEGF содержит конструкцию, представленную на **фиг. 6 панель (С)**, причем конструкция может называться конструкцией антитела (AB) и/или гAAVAnc80-AB; иллюстративная конструкция гAAVAnc80-AB кодирует бевацизумаб. В некоторых вариантах осуществления конструкции гAAVAnc80-анти-VEGF содержит конструкцию, представленную на **фиг. 6, панель (D)**, причем конструкция может называться анти-VEGF-TRAP (TRAP) и/или гAAVAnc80-TRAP; иллюстративная конструкция гAAVAnc80-TRAP кодирует афлиберцепт. В некоторых вариантах осуществления композиции, раскрытые в данном документе, например, гAAV-анти-VEGF, представляют собой композицию для генной терапии и предназначены для лечения пациентов с ВШ. В некоторых вариантах осуществления композиция, описанная в данном документе, содержит AAVAnc80, предполагаемого общего предка адено-ассоциированных вирусных (AAV) частиц серотипов 1, 2, 8 и 9 (Zinn 2015, полностью включена в данный документ посредством ссылки), в качестве средства доставки для трангена, кодирующего последовательность ранибизумаба, фрагмент антитела (Fab), ранее оптимизированный для ингибирования VEGF после внутриглазного введения (Genentech 2017, полностью включена в данный документ посредством ссылки). В некоторых вариантах осуществления композиция, раскрытая в данном документе, представляет собой икосаэдрический вирион, не имеющий оболочки, диаметром приблизительно 26 нанометров (нм). В некоторых вариантах осуществления аденоассоциированные вирусы, на которых основана раскрытая в данном документе композиция, например, синтетическая капсидная последовательность AAVAnc80, представляют собой непатогенные, содержащие одноцепочечный ДНК геном, зависимые от хелперного вируса представителя семейства Parvoviridae.

[0349] Рекомбинантные частицы AAV (гAAV), сохраняя при этом ту же общую структуру капсида, что и аденоассоциированные вирусы дикого типа, инкапсулируют геномы, которые лишены каких-либо последовательностей, кодирующих вирусный белок, и имеют кассеты экспрессии терапевтических генов, вставленные на их место.

Единственными последовательностями вирусного происхождения являются последовательности инвертированных концевых повторов (ITR), которые необходимы для управления репликацией и упаковкой генома во время производства частиц. Удаление вирусных кодирующих последовательностей максимально увеличивает упаковочную способность частиц гAAV и способствует их низкой иммуногенности и цитотоксичности при доставке *in vivo* (Wang 2019, полностью включена в данный документ посредством ссылки).

[0350] AAVAnc80 представляет собой рационально сконструированный капсид AAV, последовательность которого была установлена путем реконструкции предковой последовательности (Zinn 2015, полностью включена в данный документ посредством ссылки). Первые сообщения о применении AAVAnc80 во внутреннем ухе млекопитающих показали высокую эффективность трансдукции в волосковых клетках улитки и вестибулярной системы и подтвердили восстановление слуховой, кохлеарной и вестибулярной функции на мышинной модели с нокином (Landegger 2017; Pan 2017, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки). Последующие исследования подтвердили, что эффективность трансдукции AAVAnc80 в кохлеарные и вестибулярные клетки значительно выше, чем у других серотипов AAV у мышей (Landegger 2017; Tao 2018; Yoshimura 2018; Omichi 2020, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки) и у отличных от человека приматов (Andres-Mateos 2019, полностью включена в данный документ посредством ссылки).

[0351] В некоторых вариантах осуществления композиция, раскрытая в данном документе, например, гAAV-анти-VEGF, содержит два компонента: капсид AAVAnc80 (также называемый Anc80L65; Zinn 2015, полностью включена в данный документ посредством ссылки) и геном одноцепочечной ДНК гAAV, кодирующий анти-VEGF белок, такой как гAAV-V_H/V_L (например, ранибизумаб), гAAV-AB (например, бевацизумаб), гAAV-ABGFP (например, антитело, меченное GFP, например, ранибизумаб или бевацизумаб, меченные GFP), и/или гAAV-TRAP (например, афлиберцепт), инкапсулированный указанным капсидом AAVAnc80. В некоторых вариантах осуществления композиция, раскрытая в данном документе, например, гAAV-анти-VEGF, содержит два компонента: капсид AAVAnc80 (также называемый Anc80L65; Zinn 2015, полностью включена в данный документ посредством ссылки) и геном одноцепочечной ДНК размером 3000-5000 нуклеотидов, за исключением последовательностей ITR (например, как показано на **фиг. 6, панели (А)-(D)**), инкапсулированные указанным

капсидом AAVAnc80.

[0352] В некоторых вариантах осуществления композиция, раскрытая в данном документе, например, геном рекомбинантной ДНК конструкции фланкирован последовательностями ITR AAV2 и содержит эукариотическую экспрессионную кассету, кодирующую следующие промоторные и регуляторные последовательности: ранний энхансерный элемент цитомегаловируса (CMV); последовательность гена бета-актина курицы (*CβA*), расположенную между 5'-фланкирующей областью и проксимальной областью второго экзона; и 3'-акцепторную последовательность сплайсинга, полученную из кроличьего гена бета-глобина (*RβG*), обычно называемую промотором CAG (Miyazaki 1989; Niwa 1991; Orbán 2009, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки). В некоторых вариантах осуществления за этим гибридным регуляторным элементом следует бицистронная кассета, кодирующая тяжелую и легкую цепи ранибизумаба, разделенные сайтами расщепления фурином и протеазой вируса *Thosea asigna* 2A (T2A). В некоторых вариантах осуществления для облегчения секреции белка лидерная последовательность человеческого интерлейкина-2 (IL-2) из 20 аминокислот расположена выше каждой Fab-цепи. В некоторых вариантах осуществления композиции, раскрытой в данном документе, ниже последовательности, кодирующей белок анти-VEGF, находится сайт полиаденилирования бычьего гормона роста.

[0353] Текущий стандарт лечения ВШ изменился за последние 2–3 десятилетия по мере усовершенствования методов визуализационных исследований и улучшения способности идентифицировать и отслеживать рост опухолей. Наблюдается прогрессирующая тенденция к консервативному, наблюдательному подходу « подождать и провести повторное сканирование », с растущим пониманием того, что многие опухоли демонстрируют медленный или низкий рост и могут не влиять на слух до тех пор, пока сохраняется низкая скорость роста (MacKeith 2013; Reznitsky 2019, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки). В некоторых вариантах осуществления ключевым потенциальным преимуществом композиции, описанной в данном документе, например, гAAV-анти-VEGF, является возможность, например, усилить этот консервативный подход к лечению путем остановки роста опухоли, стабилизации слуха и/или устранения необходимости в более инвазивных методах лечения, таких как хирургическая резекция и/или лучевая терапия. Не желая быть связанными какой-либо теорией, считается, что в некоторых вариантах осуществления, хотя прекращение роста ВШ, вероятно, обеспечивает существенную клиническую пользу, также возможно, что композиция, раскрытая в данном документе, например, гAAV-анти-VEGF, может выходить

за рамки стаза опухоли и привести к уменьшению размеров опухоли, восстановлению понимания речи и/или снижению воспринимаемой трудности понимания речи, как это продемонстрировано в исследованиях опухолей ВШ, подвергнутых лечению бевацизумабом, у пациентов с NF2 (Huang 2018; Plotkin 2019, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки). Кроме того, исследования с применением системно вводимого ингибитора VEGF показали улучшение качества жизни, связанного с NF2, включая симптомы, связанные с ВШ, у пациентов с NF2 (Plotkin 2019, полностью включена в данный документ посредством ссылки). В некоторых вариантах осуществления эти клинические данные свидетельствуют о том, что введение гAAV-анти-VEGF и устойчивая и локализованная экспрессия анти-VEGF белка в диффузионной непрерывности опухоли могут обеспечить эти дополнительные преимущества для пациентов с ВШ.

[0354] В некоторых вариантах осуществления внутрикохлеарное введение композиции, описанной в данном документе, например, гAAV-анти-VEGF, может устранить необходимость в будущем лечении и сохранить физиологический слух у пациентов с ВШ, независимо от основной этиологии. В некоторых вариантах осуществления композиция, раскрытая в данном документе, может приводить к задержке применения инвазивных подходов к лечению, таких как хирургическая резекция и/или лучевая терапия, и ассоциированной с ними потери физиологического слуха. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, раскрытых в данном документе, способ дополнительно включает проведение стандартной терапии. В некоторых вариантах осуществления также может быть потенциальная польза для субъектов, которые впоследствии проходят лучевую терапию, поскольку лечение анти-VEGF белком может улучшить ответ субъекта на лучевую терапию за счет повышения чувствительности опухоли и снижения дозы облучения (Koutsimpelas 2012; Gao 2015, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки).

Конструкции AAV

[0355] Настоящее изобретение относится к полинуклеотидным конструкциям, которые содержат антитело к VEGF и/или растворимый рецептор VEGF (например, анти-VEGF TRAP белок, такой как слитый белок афлиберцепт). В некоторых вариантах осуществления, описанных в данном документе, полинуклеотид, содержащий антитело к VEGF и/или растворимый рецептор VEGF, называется конструкцией и может быть включен в капсид AAV для создания частицы гAAV. В некоторых вариантах осуществления конструкция гAAV может называться вектором и может быть количественно определена

как векторные геномы (вг); например, как вг на миллилитр (мл). Упрощенное схематическое изображение генома AAV дикого типа показано на **фиг. 5, панель (А)**, а упрощенное схематическое изображение конструкции гAAV показано на **фиг. 5, панель (В)**.

[0356] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотидная конструкция содержит один или более компонентов, полученных из встречающейся в природе геномной конструкции AAV или модифицированных из нее. В некоторых вариантах осуществления последовательность, полученная из конструкции AAV, представляет собой конструкцию AAV1, конструкцию AAV2, конструкцию AAV3, конструкцию AAV4, конструкцию AAV5, конструкцию AAV6, конструкцию AAV7, конструкцию AAV8, конструкцию AAV9, конструкцию AAV2.7m8, конструкцию AAV8BP2, конструкцию AAV293 или конструкцию AAVAnc80. Дополнительные иллюстративные конструкции AAV, которые можно использовать в данном документе, известны в данной области техники. См., например, Kanaan et al., *Mol. Ther. Nucleic Acids* 8:184-197, 2017; Li et al., *Mol. Ther.* 16(7): 1252-1260, 2008; Adachi et al., *Nat. Commun.* 5: 3075, 2014; Isgrig et al., *Nat. Commun.* 10(1): 427, 2019; and Gao et al., *J. Virol.* 78(12): 6381-6388, 2004; каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки.

[0357] В некоторых вариантах осуществления предложенные конструкции содержат кодирующую последовательность, например, анти-VEGF ген или его характерную часть, одну или более регуляторных и/или контрольных последовательностей и, необязательно, 5'- и 3'-инвертированные концевые повторы (ITR), полученные из AAV. В некоторых вариантах осуществления, в которых используется 5'- и 3'-ITR, полученный из AAV полинуклеотидная конструкция может называться рекомбинантной конструкцией AAV (гAAV). В некоторых вариантах осуществления предложенные конструкции гAAV упакованы в капсид AAV с образованием частицы гAAV.

[0358] В некоторых вариантах осуществления последовательности, полученные из AAV (которые входят в состав полинуклеотидной конструкции), обычно включают цис-действующие 5'- и 3'-последовательности ITR (см., например, В. J. Carter, in "Handbook of Parvoviruses," ed., P. Tijsser, CRC Press, pp. 155-168, 1990, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки). Иллюстративные последовательности ITR, полученные из AAV2, имеют длину около 145 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 80% иллюстративной последовательности ITR (например, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95%) включено в конструкцию, представленную в данном документе. Способность изменять эти

последовательности ITR находится в пределах квалификации специалиста в данной области техники (см., например, тексты публикаций, таких как Sambrook et al., “Molecular Cloning. A Laboratory Manual”, 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989; и K. Fisher et al., *J Virol.* 70:520-532, 1996, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки). В некоторых вариантах осуществления любая из кодирующих последовательностей и/или конструкций, описанных в данном документе, фланкирована 5'- и 3'-последовательностями ITR AAV. Последовательности ITR AAV могут быть получены из любого известного AAV, включая идентифицированные в данное время типы AAV.

[0359] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотидные конструкции, описанные в соответствии с настоящим раскрытием и по схеме, известной в данной области техники (см., например, Asokan et al., *Mol. Ther.* 20: 699-7080, 2012, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки), обычно состоят из кодирующей последовательности или ее части, по меньшей мере одной и/или контрольной последовательности, и, необязательно, 5' и 3' инвертированных концевых повторов (ITR) AAV. В некоторых вариантах осуществления предложенные конструкции могут быть упакованы в капсид для создания частицы гAAV. Частица гAAV может быть доставлена в выбранную клетку-мишень. В некоторых вариантах осуществления предложенные конструкции содержат дополнительную необязательную кодирующую последовательность, которая представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты (например, ингибиторную последовательность нуклеиновой кислоты), гетерологичную последовательностям конструкции, которая кодирует полипептид, белок, функциональную молекулу РНК (например, микроРНК, ингибитор микроРНК) или другой представляющий интерес генный продукт. В некоторых вариантах осуществления последовательность, кодирующая нуклеиновую кислоту, функционально связана с компонентами и/или контрольными компонентами таким образом, который обеспечивает транскрипцию, трансляцию и/или экспрессию кодирующей последовательности в клетке ткани-мишени.

[0360] Как показано на **фиг. 5, панель (А)**, немодифицированный эндогенный геном AAV содержит две открытые рамки считывания, «сар» и «гер», которые фланкированы ITR. Как показано на **фиг. 5, панель (В)**, иллюстративные конструкции гAAV аналогичным образом включают ITR, фланкирующие кодирующую область, например, кодирующую последовательность (например, анти-VEGF ген). В некоторых вариантах осуществления конструкция гAAV также содержит традиционные контрольные элементы, которые

функционально связаны с кодирующей последовательностью таким образом, который обеспечивает ее транскрипцию, трансляцию и/или экспрессию в клетке, трансфицированной плазмидной конструкцией или инфицированной вирусом, полученным в соответствии с настоящим изобретением. В некоторых вариантах осуществления конструкция гAAV необязательно содержит промотор (показан на **фиг. 5, панель (B)**), энхансер, нетранслируемую область (например, 5'-UTR, 3'-UTR), последовательность Козак, внутренний сайт посадки рибосомы (IRES), сайты сплайсинга (например, акцепторный сайт, донорный сайт), сайт полиаденилирования (показан на **фиг. 5, панель (B)**) или любую их комбинацию. Такие дополнительные элементы описаны далее в данном документе.

[0361] В некоторых вариантах осуществления конструкция представляет собой конструкцию гAAV. В некоторых вариантах осуществления конструкция гAAV может включать по меньшей мере 500 т.п.н., по меньшей мере 1 т.п.н., по меньшей мере 1,5 т.п.н., по меньшей мере 2 т.п.н., по меньшей мере 2,5 т.п.н., по меньшей мере 3 т.п.н., по меньшей мере 3,5 т.п.н., по меньшей мере 4 т.п.н. или по меньшей мере 4,5 т.п.н. В некоторых вариантах осуществления конструкция гAAV может включать не более 7,5 т.п.н., не более 7 т.п.н., не более 6,5 т.п.н., не более 6 т.п.н., не более 5,5 т.п.н., не более 5 т.п.н., не более 4,5 т.п.н., не более 4 т.п.н. не более 3,5 т.п.н., не более 3 т.п.н. или не более 2,5 т.п.н.. В некоторых вариантах осуществления конструкция гAAV может включать от около 1 т.п.н. до около 2 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 3 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 4 т.п.н., от около 1 т.п.н. до около 5 т.п.н., от около 2 т.п.н. до около 3 т.п.н., от около 2 т.п.н. до около 4 т.п.н., от около 2 т.п.н. до около 5 т.п.н., от около 3 т.п.н. до около 4 т.п.н., от около 3 т.п.н. до около 5 т.п.н. или от около 4 т.п.н. до около 5 т.п.н.

[0362] Любая из конструкций, описанных в данном документе, может дополнительно включать регуляторную и/или контрольную последовательность, например контрольную последовательность, выбранную из группы последовательности инициации транскрипции, последовательности терминации транскрипции, последовательности промотора, последовательности энхансера, последовательности сплайсинга РНК, последовательности полиаденилирования (поли(A)), консенсусной последовательности Козак и/или любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления промотор может представлять собой нативный промотор, конститутивный промотор, индуцибельный промотор и/или тканеспецифичный промотор. Неограничивающие примеры контрольных последовательностей описаны в данном документе.

Последовательности инвертированных терминальных повторов (ITR)

[0363] Последовательности конструкции, полученные из AAV, обычно содержат cis-действующие 5'- и 3'-ITR (см., например, В. J. Carter, in “Handbook of Parvoviruses”, ed., P. Tijsser, CRC Press, pp. 155-168 (1990), которая полностью включена в данный документ посредством ссылки). Как правило, ITR способны образовывать шпильку. Способность образовывать шпильку может способствовать способности ITR к самовоспроизведению, позволяя синтезировать вторую цепь ДНК независимо от праймазы. ITR также могут способствовать эффективному инкапсулированию конструкции гAAV в частице гAAV.

[0364] В некоторых вариантах осуществления частица гAAV (например, частица AAV2/Anc80) по настоящему изобретению может содержать конструкцию гAAV, содержащую кодирующую последовательность (например, анти-VEGF ген) и ассоциированные элементы, фланкированные 5'- и 3'-последовательностями ITR AAV. В некоторых вариантах осуществления ITR представляет собой или включает около 145 нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах осуществления используется вся или практически вся последовательность, кодирующая ITR. Последовательность ITR AAV может быть получена из любого известного AAV, включая идентифицированные в данное время типы AAV млекопитающих. В некоторых вариантах осуществления ITR представляет собой ITR AAV2.

[0365] Примером молекулы конструкции, используемой в настоящем изобретении, является «cis-действующая» конструкция, содержащая трансген, в которой выбранная последовательность трансгена и ассоциированные регуляторные элементы фланкированы 5' или «левой» и 3' или «правой» последовательностями ITR AAV. Обозначения 5' и левая относятся к положению последовательности ITR относительно всей конструкции, читаемой слева направо, в смысловом направлении. Например, в некоторых вариантах осуществления 5' или левая ITR представляет собой ITR, наиболее близкую к промотору (в отличие от последовательности полиаденилирования) для данной конструкции, когда конструкция изображена в смысловой ориентации линейно. Одновременно обозначения 3' и правая относятся к положению последовательности ITR относительно всей конструкции, читаемой слева направо, в смысловом направлении. Например, в некоторых вариантах осуществления 3' или правая ITR представляет собой ITR, наиболее близкую к последовательности полиаденилирования (в отличие от последовательности промотора) для данной конструкции, когда конструкция изображена в смысловой ориентации линейно. ITR, предложенные в данном документе, изображены в порядке от 5' до 3' в соответствии со смысловой цепью. Соответственно, специалисту в данной области техники будет

понятно, что 5' или «левая» ориентация ITR также может быть изображена как 3' или «правая» ITR при преобразовании из смыслового в антисмысловое направление. Кроме того, специалист в данной области техники вполне может преобразовать заданную смысловую последовательность ITR (например, 5'/левую ITR AAV) в антисмысловую последовательность (например, 3'/правую последовательность ITR). Специалисту в данной области техники будет понятно, как модифицировать данную последовательность ITR для использования либо в качестве 5'/левой, либо 3'/правой ITR, или ее антисмысловой версии.

[0366] Например, ITR (например, 5' ITR) может иметь последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 45. В некоторых вариантах осуществления ITR (например, 3' ITR) может иметь последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 46. В некоторых вариантах осуществления ITR содержит одну или более модификаций, например усечения, делеции, замены или вставки, как известно в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления ITR содержит менее 145 нуклеотидов, например, 127, 130, 134 или 141 нуклеотид. Например, в некоторых вариантах осуществления ITR содержит 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144 или 145 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления ITR (например, 5' ITR) может иметь последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 47. В некоторых вариантах осуществления ITR (например, 3' ITR) может иметь последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 48.

[0367] Неограничивающим примером 5'-последовательности ITR AAV является SEQ ID NO: 45. Неограничивающим примером 3'-последовательности ITR AAV является SEQ ID NO: 46. Неограничивающим примером 5'-последовательности ITR AAV является SEQ ID NO: 47. Неограничивающим примером 3'-последовательности ITR AAV является SEQ ID NO: 48. В некоторых вариантах осуществления конструкции гAAV по настоящему изобретению содержат 5' ITR AAV и/или 3' ITR AAV. В некоторых вариантах осуществления 5' последовательность ITR AAV представляет собой SEQ ID NO: 45. В некоторых вариантах осуществления 3' последовательность AAV ITR представляет собой SEQ ID NO: 46. В некоторых вариантах осуществления 5' и 3' ITR AAV (например, SEQ ID NO: 45 и 46 или 47 и 48) фланкируют часть кодирующей последовательности, например, весь ген или часть анти-VEGF гена (например, SEQ ID NO: 13, 14, 15, 19, 22, 42 и/или 103). Возможность модифицировать эти последовательности ITR находится в пределах данной области техники. (См., например, такие тексты, как Sambrook et al. "Molecular Cloning. A Laboratory Manual", 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1989); и K. Fisher et al.,

J Virol., 70:520-532 (1996), каждый из которых полностью включен в данный документ посредством ссылки). В некоторых вариантах осуществления последовательность 5' ITR по меньшей мере на 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентична последовательности 5' ITR, представленной SEQ ID NO: 45 или 47. В некоторых вариантах осуществления последовательность 3' ITR по меньшей мере на 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентична последовательности 3'-ITR, представленной SEQ ID NO: 46 или 48.

[0368] Иллюстративная 5'-последовательность ITR AAV (SEQ ID NO: 45)

TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCC
GGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGA
GGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCT

[0369] Иллюстративная 3'-последовательность ITR AAV (SEQ ID NO: 46)

AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTG
AGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCAGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTG
AGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAA

[0370] Иллюстративная 5'-последовательность ITR AAV (SEQ ID NO: 47)

CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCC
GGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGG
GTTCCT

[0371] Иллюстративная 3'-последовательность ITR AAV (SEQ ID NO: 48)

AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTG
AGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCAGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTG
AGCGAGCGAGCGCGCAG

Промоторы

[0372] В некоторых вариантах осуществления конструкция (например, конструкция гAAV) содержит промотор. Термин «промотор» относится к последовательности ДНК, распознаваемой ферментами/белками, которая может стимулировать и/или инициировать транскрипцию функционально связанного гена (например, анти-VEGF гена). Например, промотор обычно относится, например, к нуклеотидной последовательности, с которой связывается РНК-полимераза и/или любой ассоциированный фактор и с которой он может инициировать транскрипцию. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления конструкция (например, конструкция гAAV) содержит промотор, функционально связанный с одним из неограничивающих иллюстративных промоторов, описанных в

данном документе.

[0373] В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой индуцибельный промотор, конститутивный промотор, промотор клеток млекопитающих, вирусный промотор, химерный промотор, сконструированный промотор, тканеспецифичный промотор или любой другой тип промотора, известный в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой промотор РНК-полимеразы II, такой как промотор РНК-полимеразы II млекопитающих. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой промотор РНК-полимеразы III, включая, но не ограничиваясь этим, промотор H1, промотор U6 человека, промотор U6 мыши или промотор U6 свиньи. Как правило, промотор является промотором, способным стимулировать транскрипцию в клетке внутреннего уха. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой промотор, специфичный для улитки, или промотор, ориентированный на улитку. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой промотор, специфичный для волосковых клеток, или промотор, специфичный для поддерживающих клеток.

[0374] В данной области техники известно множество промоторов, которые можно использовать в данном документе. Неограничивающие примеры промоторов, которые можно использовать в данном документе, включают промоторы от: EFla человека, цитомегаловируса человека (CMV) (патент США № 5 168 062, который полностью включен в данный документ посредством ссылки), убиквитина С человека (UBC), фосфоглицерат киназы 1 мыши, полиомы аденовируса, вируса обезьяны 40 (SV40), β -глобина, β -актина, α -фетопротеина, γ -глобина, β -интерферона, γ -глутамилтрансферазы, вируса опухоли молочной железы мыши (MMTV), вируса саркомы Рауса, инсулина крысы, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы, металлотioneина II (MT II), амилазы, катепсина, мускаринового рецептора M1, ретровирусного LTR (например вируса Т-клеточного лейкоза человека HTLV), ITR AAV, интерлейкина-2, коллагеназы, полученного из тромбоцитов фактора роста, аденовируса 5 E2, стромелизина, гена MX мыши, белков, регулируемых глюкозой (GRP78 и GRP94), α -2-макроглобулина, виментина, гена ГКГС класса I, H-2k b, HSP70, пролиферина, фактора некроза опухоли, гена α тиреотропного гормона, легкой цепи иммуноглобулина, Т-клеточного рецептора, DQ α и DQ β HLA, рецептора интерлейкина-2, ГКГС класса II, HLA-DR α ГКГС класса II, мышечной креатинкиназы, преальбумина (транстиретины), эластазы I, гена альбумина, c-fos, c-HA-gas, молекулы адгезии нервных клеток (NCAM), гистона H2B (TH2B), гормона роста крысы, сывороточного амилоида человека (SAA), тропонина I (TN I), мышечной дистрофии Дюшенна, вируса

иммунодефицита человека и вируса лейкоза гиббонов (GALV). Дополнительные примеры промоторов известны в данной области техники, см., например, Lodish, *Molecular Cell Biology*, Freeman and Company, New York 2007, каждая из которых включена в данный документ путем ссылки. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой немедленно-ранний промотор CMV. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой промотор CAG или промотор CAG/CBA. В некоторых вариантах осуществления промотор содержит или состоит из SEQ ID NO: 49. В некоторых вариантах осуществления промотор содержит или состоит из SEQ ID NO: 50. В определенных вариантах осуществления промотор содержит конструкцию энхансер/промотор CMV/CBA, представленную в качестве примера в SEQ ID NO: 51. В определенных вариантах осуществления промотор содержит конструкцию энхансер/промотор CMV/CBA, представленную в качестве примера в SEQ ID NO: 52. В определенных вариантах осуществления промотор включает промотор CAG или конструкцию энхансер/промотор CMV/CBA/SV-40, представленные в качестве примера в SEQ ID NO: 53. В определенных вариантах осуществления промотор включает промотор CAG или конструкцию энхансер/промотор CMV/CBA/SV-40, представленные в качестве примера в SEQ ID NO: 54. В некоторых вариантах осуществления последовательность промотора по меньшей мере на 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентична последовательностям промоторов, представленным SEQ ID NO: 49 или 50. В некоторых вариантах осуществления последовательность конструкции энхансер-промотор по меньшей мере на 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентична последовательности конструкции энхансер-промотор, представленной SEQ ID NO: 51, 52, 53 или 54.

[0375] Термин «конститутивный» промотор относится к нуклеотидной последовательности, которая, если она функционально связана с нуклеиновой кислотой, кодирующей белок (например, анти-VEGF белок), вызывает транскрипцию РНК из нуклеиновой кислоты в клетке при большинстве или во всех физиологических условиях.

[0376] Примеры конститутивных промоторов включают, без ограничения, промотор LTR ретровирусного вируса саркомы Рауса (RSV), промотор цитомегаловируса (CMV) (см., например, Boshart et al, *Cell* 41:521-530, 1985, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки), промотор SV40, промотор дигидрофолатредуктазы, промотор бета-актина, промотор фосфоглицеролкиназы (PGK) и промотор EF1-альфа (Invitrogen).

[0377] Индуцибельные промоторы позволяют осуществлять регуляцию экспрессии генов, и их можно регулировать с помощью экзогенно поставляемых соединений, факторов

окружающей среды, таких как температура, или наличия специфического физиологического состояния, например, острой фазы, конкретного состояния дифференцировки клетки или только в реплицирующихся клетках. Индуцибельные промоторы и индуцибельные системы доступны из множества коммерческих источников, включая, помимо прочего, компании Invitrogen, Clontech и Ariad. Дополнительные примеры индуцибельных промоторов известны в данной области техники.

[0378] Примеры индуцируемых промоторов, регулируемых экзогенно поставляемыми соединениями, включают индуцируемый цинком промотор овечьего металлотионина (MT), промотор дексаметазон (Dex)-индуцируемого вируса опухоли молочной железы мыши (MMTV), промоторную систему полимеразы T7 (WO 98/10088, который полностью включен в данный документ посредством ссылки); промотор экдизона насекомых (No et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93:3346-3351, 1996, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки), тетрациклин-репрессируемую систему (Gossen et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:5547-5551, 1992, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки), тетрациклин-индуцируемую систему (Gossen et al. Science 268:1766-1769, 1995, см. также Harvey et al. Curr. Opin. Chem. Biol. 2:512-518, 1998, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки), RU486-индуцируемая система (Wang et al, Nat. Biotech. 15:239- 243, 1997, and Wang et al, Gene Ther. 4:432-441, 1997, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки), и индуцируемая рапамицином система (Magari et al. J Clin. Invest. 100:2865-2872, 1997, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки).

[0379] Термин «тканеспецифичный» промотор относится к промотору, который активен только в определенных типах клеток и/или тканях (например, транскрипция определенного гена происходит только в клетках, экспрессирующих регуляторные и/или контрольные белки транскрипции, которые связываются с тканеспецифичным промотором). В некоторых вариантах осуществления регуляторные и/или контрольные последовательности придают возможность тканеспецифичной экспрессии генов. В некоторых случаях тканеспецифичные регуляторные и/или контрольные последовательности связывают тканеспецифичные транскрипционные факторы, которые индуцируют транскрипцию тканеспецифичным образом.

[0380] В некоторых вариантах осуществления тканеспецифичный промотор представляет собой специфичный для улитки промотор. В некоторых вариантах осуществления тканеспецифичный промотор представляет собой промотор, специфичный для волосковых клеток улитки. Неограничивающие примеры специфичных для

волосковых клеток улитки промоторов включают, без ограничения, промотор АТОН1, промотор POU4F3, промотор LHX3, промотор MYO7A, промотор MYO6, промотор α 9ACHR и промотор α 10ACHR. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой специфичный для волосковых клеток улитки промотор, такой как промотор PRESTIN или промотор ONCOMOD. См., например, Zheng et al., Nature 405:149-155, 2000; Tian et al. Dev. Dyn. 23 1: 199-203, 2004; и Ryan et al., Adv. Otorhinolaryngol. 66: 99-115, 2009, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки.

[0381] В некоторых вариантах осуществления тканеспецифичный промотор представляет собой специфичный для клеток уха промотор. В некоторых вариантах осуществления тканеспецифичный промотор представляет собой промотор, специфичный для клеток внутреннего уха промотор. Неограничивающие примеры промоторов, специфичных для несенсорных клеток внутреннего уха, включают, но не ограничиваются ими: GJB2, GJB6, SLC26A4,TECTA, DFNA5, COCH, NDP, SYN1, GFAP, PLP, TAK1 или SOX21. В некоторых вариантах осуществления кохлеарный промотор, специфичный для несенсорных клеток, может представлять собой промотор, специфичный для поддерживающих клеток внутреннего уха. Неограничивающие примеры промоторов, специфичных для поддерживающих клеток внутреннего уха, включают, но не ограничиваются ими: SOX2, FGFR3, PROX1, GLAST1, LGR5, HES1, HES5, NOTCH1, JAG1, CDKN1A, CDKN1B, SOX10, P75, CD44, HEY2, LFNG или S100b.

[0382] В некоторых вариантах осуществления предложенные конструкции гAAV содержат последовательность промотора, выбранную из промотора CAG, CBA, CMV или CB7. В некоторых вариантах осуществления любой из терапевтических композиций, описанных в данном документе, первая и/или единственная конструкция гAAV дополнительно содержит по меньшей мере одну последовательность промотора, выбранную из промоторов, специфичных для улитки и/или внутреннего уха.

[0383] Иллюстративный промотор CBA (SEQ ID NO: 49)

```
GTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCTCCCCACCCC  
CAATTTTGTATTTATTTATTTTAAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGG  
GGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAG  
GCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCSTTTTA  
TGCGGAGGCGGCGGCGGCGGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGGCGGGCG
```

[0384] Иллюстративный промотор CBA (SEQ ID NO: 50)

GTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCTCCCCACCCC
CAATTTTGTATTTATTTATTTTTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGG
GGGGGCGCGGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGC
GGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATG
GCGAGGCGGCGGCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGGCGGGCG

[0385] Иллюстративный энхансер/промотор CMV/CBA (SEQ ID NO: 51)

GACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATA
GCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGAC
CGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGC
CAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCCCACT
TGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACG
GTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTT
GGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGGTCGAGGTGAGCCCCACG
TTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTTTGTATTTATTTAT
TTTTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAG
GCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGG
CAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGGCG
CGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGGCGGGCG

[0386] Иллюстративная конструкция энхансер/промотор CMV/CBA (SEQ ID NO: 52)

GACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATA
GCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGAC
CGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGC
CAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCCCACT
TGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACG
GTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTT
GGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGGTCGAGGTGAGCCCCACG
TTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTTTGTATTTATTTAT
TTTTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGC
GGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGGCA
GCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGGCGGCG
GCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGGCGGGCG

[0387] Иллюстративная конструкция энхансер/промотор CAG (SEQ ID NO: 53)

GACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATA
GCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGAC
CGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGC
CAATAGGGACTTTCATTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCCACT
TGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACG
GTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTT
GGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGGTCGAGGTGAGCCCCACG
TTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTTTGTATTTATTTAT
TTTTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAG
GCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGCGGAGAGGTGCGGGCGG
CAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGGCGGCGGCGG
CGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGGCGGGAGTCGCTGCGTTGCCTTC
GCCCCGTGCCCGCTCCGCGCCGCCTCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGC
GTTACTCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCG
CTTGGTTTAATGACGGCTCGTTTCTTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTAAAGGGCTC
CGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCGTGTGTGTGT
GCGTGGGGAGCGCCGCGTGC GGCCCGCGCTGCCCGGCGGCTGTGAGCGCTGCGGGC
GCGGCGCGGGGCTTTGTGCGCTCCGCGTGTGCGCGAGGGGAGCGCGGCCGGGGGCG
GTGCCCCGCGGTGCGGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAAGGCTGCGTGC GGGGTGTGT
GCGTGGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGCGGCGGTCGGGCTGTAACCCCCCT
GCACCCCCCTCCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTGC
GGGGCGTGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGGGGTGGCGGCAGGTGGGGGTG
CCGGGCGGGGCGGGGCCGCCTCGGGCCGGGGAGGGCTCGGGGGAGGGGCGCGGGCG
GCCCCCGGAGCGCCGGCGGCTGTGAGGCGCGGCGAGCCGCAGCCATTGCCTTTTA
TGTAATCGTGCGAGAGGGCGCAGGGACTTCTTTTGTCCCAAATCTGTGCGGAGCCG
AAATCTGGGAGGCGCCGCGCACCCCCCTTAGCGGGCGCGGGGCGAAGCGGTGCGG
CGCCGGCAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTCGCCGCGCCGCGTC
CCCTTCTCCCTCTCCAGCCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGGACGGCTGCCTTCGGGGGG
GACGGGGCAGGGCGGGGTTCGGCTTCTGGCGTGTGACCGGCGGCTCTAGAGCCTCT
GCTAACCATGTTTCATGCCTTCTTCTTTTCTTCTACAG

[0388] Иллюстративная конструкция энхансер/промотор CAG (SEQ ID NO: 54)

GACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATA
GCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGAC
CGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGC

CAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCCCACT
TGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACG
GTAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTT
GGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGGTCGAGGTGAGCCCCACG
TTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTTTGTATTTATTTAT
TTTTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGC
GGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCA
GCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCG
GCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGCGGGCGGGAGTCGCTGCGTTGCCTTCGC
CCCGTGCCCCGCTCCGCGCCGCTCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGT
TACTCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCGCT
TGGTTTAATGACGGCTCGTTTCTTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTAAAGGGCTCC
GGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCGTGTGTGTGTG
CGTGGGGAGCGCCGCGTGCGGCCCGCGCTGCCCGGCGGCTGTGAGCGCTGCGGGCG
CGGCGCGGGGCTTTGTGCGCTCCGCGTGTGCGGAGGGGAGCGCGGCCGGGGGCGG
TGCCCCGCGGTGCGGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAAGGCTGCGTGCGGGGTGTGTG
CGTGGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGCGGCGGTCGGGCTGTAACCCCCCTG
CACCCCCCTCCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTGCG
GGGCGTGGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGGGGTGGCGGCAGGTGGGGGTGC
CGGGCGGGGCGGGGCCCTCGGGCCGGGAGGGCTCGGGGGAGGGGCGCGGCGG
CCCCCGAGCGCCGGCGGCTGTCGAGGCGCGGCGAGCCGCAGCCATTGCCTTTTAT
GGTAATCGTGCGAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCCAAATCTGTGCGGAGCCG
AAATCTGGGAGGCGCCGCGCACCCCCTCTAGCGGGCGCGGGGCGAAGCGGTGCGG
CGCCGGCAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTCGCCGCGCCGCCGTC
CCCTTCTCCCTCTCCAGCCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGGACGGCTGCCTTCGGGGG
GACGGGGCAGGGCGGGGTTCGGCTTCTGGCGTGTGACCGGCGGCTCTAGAGCCTCT
GCTAACCATGTTTCATGCCTTCTTCTTTTCTTCTACAG

[0389] В определенных вариантах осуществления промотор представляет собой эндогенную конструкцию энхансер-промотор АТОН1 человека, как указано в SEQ ID NO: 55. В некоторых вариантах осуществления последовательность конструкции энхансер-промотор по меньшей мере на 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентична последовательности конструкции энхансер-промотор, представленной SEQ ID NO: 55.

[0390] Иллюстративная конструкция энхансер-промотор АТОН1 человека (SEQ ID NO: 55)

CTATGGAGTTTGCATAACAAACGTTTGGCAGCTCGCTCTCTTACACTCCATTAACAA
GCTGTAACATATAGCTGCAGGTTGCTATAATCTCATTAAATATTTTGGAAACTTGAAT
ATTGAGTATTTCTGAGTGCTCATTCCCCATATGCCAGCCACTTCTGCCATGCTGACTG
GTTCCCTTTCTCTCCATTATTAGCAATTAGCTTCTTACCTTCCAAAGTCAGATCCAAGG
TATCCAAGATACTAGCAAAGGAATCAACTATGTGTGCAAGTTAAGCATGCTTAATAT
CACCCAAACAAACAAAGAGGCAGCATTCTTAAAGTAATGAAGATAGATAAATCGG
GTTAGTCCTTTGGCAGACTGCTGGTGCTTTCTAGAGTTTTATATATTTTAAGCAGCTT
GCTTTATATTCTGTCTTTGCCTCCCACCCACCAGCACTTTTATTTGTGGAGGGTTTT
GGCTCGCCACACTTTGGGAAACTTATTTGATTTACGGAGAGCTGAAGGAAGATCAT
TTTTGGCAACAGACAAGTTTAAACACGATTTCTATGGGACATTGCTAACTGGGGCCC
CTAAGGAGAAAGGGGAAACTGAGCGGAGAATGGGTAAATCCTTGAAGCAGGGG
AGAGGCAGGGGAGGAGAGAAGTCGGAGGAGTATAAAGAAAAGGACAGGAACCAA
GAAGCGTGGGGGTGGTTTGCCGTAATGTGAGTGTTTCTTAATTAGAGAACGGTTGAC
AATAGAGGGTCTGGCAGAGGCTCCTGGCCGCGGTGCGGAGCGTCTGGAGCGGAGCA
CGCGCTGTCAGCTGGTGAGCGCACTCTCCTTTCAGGCAGCTCCCCGGGGAGCTGTGC
GGCCACATTTAACACCATCATCACCCCTCCCCGGCCTCCTCAACCTCGGCCTCCTCCT
CGTCGACAGCCTTCTTGGCCCCACCAGCAGAGCTCACAGTAGCGAGCGTCTCTCG
CCGTCTCCCGCACTCGGCCGGGGCCTCTCTCCTCCCCAGCTGCGCAGCGGGAGCCG
CCACTGCCCACTGCACCTCCCAGCAACCAGCCCAGCACGCAAAGAAGCTGCGCAA
GTTAAAGCCAAGCAATGCCAAGGGGAGGGGAAGCTGGAGGCGGGCTTTGAGTGGCT
TCTGGGCGCCTGGCGGGTCCAGAATCGCCCAGAGCCGCCCGCGGTCTGTGCACATCT
GACCCGAGTCAGCTTGGGCACCAGCCGAGAGCCGGCTCCGCACCGCTCCCGCACCC
CAGCCGCCGGGGTGGTGACACACACCGGAGTCGAATTACAGCCCTGCAATTAACAT
ATGAATCTGACGAATTTAAAAGAAGGAAAAAAAAAAAAAAAAACCTGAGCAGGCTTG
GGAGTCTCTGCACACAAGAACTTTTCTCGGGGTGTAAAAACTCTTTGATTGGCTGC
TCGCACGCGCCTGCCCGCGCCCTCCATTGGCTGAGAAGACACGCGACCGGCGCGAG
GAGGGGGTTGGGAGAGGAGCGGGGGGAGACTGAGTGGCGCGTGCCGCTTTTTAAAG
GGGCGCAGCGCCTTCAGCAACCGGAGAAGCATAGTTGCACGCGACCTGGTGTGTGA
TCTCCGAGTGGGTGGGGGAGGGTCGAGGAGGGAAAAAAAAATAAGACGTTGCAGA
AGAGACCCGGAAAGGGCCTTTTTTTTTGGTTGAGCTGGTGTCCCAGTGCTGCCTCCGA
TCCTGAGCCTCCGAGCCTTTGCAGTGCAA

[0391] В определенных вариантах осуществления промотор представляет собой эндогенный немедленный промотор SLC26A4 человека, как указано в SEQ ID NO: 56 или 57. В определенных вариантах осуществления промотор представляет собой эндогенную

конструкцию энхансер-промотор SLC26A4 человека, как указано в SEQ ID NO: 58, 59 или 60. В некоторых вариантах осуществления последовательность конструкции энхансер-промотор по меньшей мере на 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентична последовательности промотора или конструкции энхансер-промотор, представленным SEQ ID NO: 56, 57, 58, 59 или 60. В определенных вариантах осуществления промотор представляет собой последовательность эндогенной конструкции энхансер-промотор SLC26A4 человека, содержащуюся в SEQ ID NO: 58, 59 или 60.

[0392] Иллюстративный немедленный промотор SLC26A4 человека (SEQ ID NO: 56)

CTGCCTTCTGAGAGCGCTATAAAGGCAGCGGAAGGGTAGTCCGCGGGGCATTCCGG
GCGG

[0393] Иллюстративный немедленный промотор SLC26A4 человека (SEQ ID NO: 57)

CTCTAGGCGGGCTCTGCTCTTCTTTAAGGAGTCCCACAGGGCCTGGCCCGCCCCTGA
CCT

[0394] Иллюстративная конструкция энхансер-промотор SLC26A4 человека (SEQ ID NO: 58)

TAAAGAGTTGTGAGTTGTGTAGGTGAGTTGCCATGGAGCTACAAATATGAGTTGATA
TTCTGAAATCCTAGACAGCCATCTCCAAGGTTAAGAAAAATCCTTATGCACTCACTT
GCAAAGATATCCACAGCATGCTCTTAATGGAGAAAAACAAAGCCTTAGATCAAATA
TGTAAGTAATTTTTAGTTTTTTGAAAAGGTATGTTTGGGCTATAGATAAATCTGTTC
AAAAACATGAGAGAAGATAATAATGGTTGAAAGGAGACACAGTGCTTGCCCTCAA
GAAGTTTTTGTCTAGTGAGGGAGAGAGAACTTGTATGTAAATAAAATTGTGTTACTA
AGGTAGATAGTGAGAAGTAACTTAAGAGAGGATCAGATAAGGTATTAAGAGAATAC
AGAAAAGGGTCTGGATTAATTCTGAACAGCATCAAAGAATGTTCTTGCAAGAGATA
GTGTTTTACCAGATCTTGAAGGTATGGATGAGGGTATACAGAGTGAGTATATTCAG
ATTCTACTTTAAAACAAATACTTTCTCTGTTGTAGTGGAGTTGAGCTATACATCCAA
CAATAATGAAAAAATACACGCATATATACATATATGGAGAGAGATACATATTTTAG
TACATGTAGCAATTGATTAATAAATGTACAGTTTAAGTCGCATGCAAAACCTTGAG
TGATAGCAAACCTTCATTGTAGGATGTTTAGCAGCATCTCTGGTCTCTACTCACTAGA
TCCCAATAGCATCTCCCTAGGTGTGACAACCAAAAATGTCTCCAGGCATTGACCTCT
GGAGGCAAAAAAAGCCCTTTATTAAGAACCAGTGGTATACATAAGTAAAACATACA
CAAGAGATTCCTCCCCTCTCTCTGTATGTGAATAAAAATTGCAAAGTTCATGACCT

GGATTTTCCTTTTAGGTTTCTTCTTTAGTGGTTCTTAACTTCATTGGGTGAAGTAAGC
CTTTGAAGATCTGTTGAAAGCTGTTGACTCATTCACTTCTCAGGAAAACGCACATGC
TGACTIONATTTCAGAGAATTTGCATCAGGGTTCTCTGGGGAGGAGTTCTGAGTTCT
GTTTCCAGGAGCTCGTAGAATTGTCATGGTCTGCATATGCAAGGCAGGTGGATTACG
GAAGGTTGATGTACAGAGGTCTGTATTTTGGAGCCTCTTCTGTATTTACTTCAGAAC
ACTAACAATCAGGCGAGAATGTTCTGGTTTATCAAACCCTTCCTTCTGCCTTTCATCT
TAACCATGCATTAGTTTTTAACAAAGTTCATCCCAACAGAAGACAAAACACTGATGA
GGTAGGATAGCTCCAGCTCCTCCTCCCTCTCTTCTAGTCTTGATTTCCATGTAGTCCA
GTTTATTCTTCCCTGATTGTCCAGGAGAATGAGAAAAAGAAAAACAGAGTCTAG
TGGGTAAGAAAGGGCCACCTGGACGGCTTGATTTGGATTGTGAAATAAAACACACA
CACATGCACACGTAGAATAAGTGGCTAAAATCTGAGTAAATCGTGAACCTCTCTGTAT
CCTCCACCCATTGAATACTCCTAAAAGACTTTCTAGAAATTCAAGGACTTATTAATA
TAGAAACCTGGCCATTGTTCTCTTCTCCTCCCCATGTGGTATGAGAGCACCTGTGG
CAGGCTCCCAGAGACCACGGACCTTTCCTCTAGGCGGGCTCTGCTCTTCTTTAAGG
AGTCCCACAGGGCCTGGCCCGCCCTGACCTCGCAACCCTTGAGATTAGTAACGGG
ATGAGTGAGGATCCGGGTGGCCCTGCGTGGCAGCCAGTAAGAGTCTCAGCCTTCC
CGGTTCCGGGAAAGGGGAAGAATGCAGGAGGGGTAGGATTTCTTTCCTGATAGGATC
GGTTGGGAAAGACCGCAGCCTGTGTGTGTCTTTCCTTCGACCAAGGTGTCTGTTGC
TCCGTAAATAAAACGTCCCACTGCCTTCTGAGAGCGCTATAAAGGCAGCGGAAGGG
TAGTCCGCGGGGC

[0395] Иллюстративная конструкция энхансер-промотор SLC26A4 человека (SEQ ID NO: 59)

GGCTGCTCGGAAAACAGGACGAGGGGAGAGACTTGCTCAATAAGCTGAAAGTTCTG
CCCCGAGAGGGCTGCGACAGCTGCTGGAATGTGCCTGCAGCGTCCGCCTCTTGGG
GACCCGCGGAGCGCGCCCTGACGGTTCACGCCTGGCCCGGGGTCTGCACCTCTCC
TCCAGTGCGCACCTGGAGCTGCGTCCCGGGTCAGGTGCGGGGAGGGAGGGAATCTC
AGTGTCCCCTTCCAGCCTTGCAAGCGCCTTTGGCCCTGCCCCAGCCCCTCGGTTTGG
GGGAGATTTAGAACGCGGACAGCGCCCTGGCTGCGGGCCATAGGGGACTGGGTGG
AACTCGGGAAGCCCCAGAGCAGGGGCTTACTCGCTTCAAGTTTGGGGAACCCCGG
GCAGCGGGTGCAGGCCACGAGACCCGAAGGTTCTCAGGTGCCCCCTGCAGGCTGG
CCGTGCGCGCCGTGGGGCGCTTGTCGCGAGCGCCGAGGGCTGCAGGACGCGGACCA
GACTCGCGGTGCAGGGGGGCTGGCTGCAGCTAACAGGTGATCCCGTTCTTTCTGTT
CCTCGCTCTTCCCCTCCGATCGTCCTCGCTTACCGCGTGTCTCCTCCTCCTCGCTGTCT
CTGGCTCGCAGGTCATGGCAGCGCCAGGCGGCAGGTGCGAGCCGCCGAGCTCCCC

GAGTACAGCTGCAGCTACATGGTGTGCGCGGCCGGTCTACAGCGAGCTCGCTTTCCAG
CAACAGCACGAGCGGCGCCTGCAGGAGCGCAAGACGCTGCGGGAGAGCCTGGCCA
AGTGCTGCAGGTAGCGGCCGCGCGGGCCTGCGTAGAGAGAAGCGGAGCGGGGCGT
CCACGCCTTGGGGAGGGAAGGGCGTCCCCAGCGGGCGAGAGTGGGGTGCGGGCGG
CGGAGCCCCTGGGCGCCAGCTGCTTCTCCCAGAGGCCCGACTTTCGGTCTCCGGTCC
TCCACGCCGCCCTTCTGGTGGGAGGGTGGCTCCATCAGTCTCGGGCCCGAAATGAAC
TTACCTGGGAAACTCGCCTTTGGGGAGAGTGGGTCTAGGAGCCCCGTCTCTCTTTT
TCCTCTCTGAAGGAAACTTGGAGTGCCTCTTGGGGTACAGTGGGTCCCTGTTGCCTT
CTTGGGAGCTTGTTTAAATGAAATGAATAGGGAAACCCAGCTCTTGACCAGGAGGA
GTCCTTGAAACACTCAAGCTAAGTAGGCGGGCTACCATTCAGTTAGAGACCAGGAT
GCAAGCTAGAACCCAGGGGAGCGCGGGGTGTGCCAAGTACTTCATCAGCAGGCTGT
GGGACCCCTGGGGAAAGCCACCCTCAGTCTCTAAACCCAAACATGCCGTAACCTAGA
TGTCACAAACATAAAGAAATTAGAGTTTCTAAAACCTTTCATTATAG

[0396] Иллюстративная конструкция энхансер-промотор SLC26A4 человека (SEQ ID NO: 60)

CGGAAGGTTGATGTACAGAGGTCTGTATTTTGGAGCCTCTTCTGTATTTACTTCAGA
ACACTAACAATCAGGCGAGAATGTTCTGGTTTATCAAACCCTTCCTTCTGCCTTTCAT
CTTAACCATGCATTAGTTTTAACAAAGTTCATCCCAACAGAAGACAAAACACTGATG
AGGTAGGATAGCTCCAGCTCCTCCTCCCTCTCTTCTAGTCTTGATTTCCATGTAGTCC
AGTTTATTCCTTCCTGATTGTCCAGGAGAATGAGAAAAAGAAAAACAGAGTCTA
GTGGGTAAGAAAGGGCCACCTGGACGGCTTGATTTGGATTGTGAAATAAAACACAC
ACACATGCACACGTAGAATAAGTGGCTAAAATCTGAGTAAATCGTGAACCTCTCTGT
ATCCTCCACCCATTGAATACTCCTAAAAGACTTTCTAGAAATTC AAGGACTTATTA
TATAGAAACCTGGCCATTGTTCTCTTCTCCTCCCCATGTGGTATGAGAGCACCTGTG
GCAGGCTCCAGAGACCACGGACCTTTCCTCTAGGCGGGCTCTGCTCTTCTTTAAG
GAGTCCCACAGGGCCTGGCCCGCCCCTGACCTCGCAACCCTTGAGATTAGTAACGG
GATGAGTGAGGATCCGGGTGGCCCCTGCGTGGCAGCCAGTAAGAGTCTCAGCCTTC
CCGGTTCGGGAAAGGGGAAGAATGCAGGAGGGGTAGGATTTCTTTCCTGATAGGAT
CGGTTGGGAAAGACCGCAGCCTGTGTGTGTCTTTCCCTTCGACCAAGGTGTCTGTTG
CTCCGTAATAAAACGTCCC ACTGCCTTCTGAGAGCGCTATAAAGGCAGCGGAAGG
GTAGTCCGCGGGGCATTCCGGGCGGGGCGCGAGCAGAGACAGGTGAGTT

[0397] В определенных вариантах осуществления промотор представляет собой конструкцию энхансер-промотор LGR5 человека, как указано в SEQ ID NO: 61. В некоторых вариантах осуществления последовательность конструкции энхансер-промотор

по меньшей мере на 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентична последовательности конструкции энхансер-промотор, представленной SEQ ID NO: 61. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой последовательность эндогенной конструкции энхансер-промотор LGR5 человека, содержащуюся в SEQ ID NO: 61.

[0398] Иллюстративная конструкция энхансер-промотор LGR5 человека (SEQ ID NO: 61)

AGGGCTATTTGTACCTCAACGAGGGCTTCTCTCCAAGAAAGCCCTGAATCCTTTTCC
TCCTTTTTCCTGCAGATTCACATAGGACACTTTTTGAAGCAAGAGCATGCATTTTCC
CCCTGGCGCTCTGCAGCGGTTCTCAGAGCCCAGTGTCACATAGGTGGGACTGC
TCTCAGTTCAGAGAGCGCTGGGACACTTAAGATGAAAAGTCCCTGGAAGTTAGCAA
ACAGCCATCTGTCACTCTGGCATCGATTTACTAAAAGTGAAGTCTAGGGTATTCTAA
ACCACTTTTAAAAACAAATGAGTCACTTCGACTTCCTCACCCCGCAAGAGATAGGA
AGGCAGCAGTGGAGTGCTCGCTCAGGAGCTGTATTTGTTTAGCGATTAGCCTAGAGC
TTTGATTTTAGGGCAAAGCGAGCCAGACAGTGCGGCAGACGTAAGGATCAAAAAG
GCCACCTATCATTCGCCGGGGACGCCTGCCTCCTTACCCTGATAACGTAACATTTCT
CTGCATAGGATTTTAGTTTTGTGTTTTGTGTTTTGTTTTATTCTGTTTAATCACTTCAA
GTATCTCATCCATTATTTGAAGCGGGCTCGGAGGAAACGTGCCGCATCCTCCAGTCC
TTGTGCGTCTGTTTAGGTCTCTCCGAAGCAGGTCCCTCTCGACTCTTAGATCTGGGT
TCCAGCACGCATGAAGGGGTAAGGGTGGGGGGGTCCCCTATTCCGGCGCGCGGGCGT
TGAGCACTGAATCTTCCAGGCGGAGGCTCAGTGGGAGCGCCGAGAACTCGCCAGTA
CCGCGCGCTGCCTGCTGCCTGCCCTCCAGCCCAGGACTTGGGAAAGGAGGGAG
GGGACAAGTGGAGGGAAAGTGGGGCCGGGCGGGGGGTGCCTGGGAAGCCAGGCTG
CGCTGACGTCACCTGGGCGCGCAATTCGGGCTGGAGCGCTTTAAAAACGAGCGTGC
AAGCAGAGATGCTGCTCCACACCGCTCAGGCCGCGAGCAGCAGCAAGGCGCACCGC
CACTGTCGCCGCTGCAGCCAGGGCTGCTCCGAAGGCCGGCGTGGCGGCAACCGGCA
CCTCTGTCCCCGCCGCGCTTCTCCTCGCCGCCACGCCGTGGGGTCAGGAACGCGGC
GTCTGGCGCTGCAGACGCCCGCTGAGTTGCAGAAGCCCACGGAGCGGCGCCCGGCG
CGCCACGGCCCGTAGCAGTCCGGTGCTGCTCTCCGCCCGCGTCCGGCTCGTGGCCCC
CTACTTCGGGCACCGACCGGT

[0399] В определенных вариантах осуществления промотор представляет собой конструкцию энхансер-промотор SYN1 человека, как указано в SEQ ID NO: 62. В некоторых вариантах осуществления последовательность конструкции энхансер-промотор по меньшей мере на 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентична последовательности конструкции энхансер-промотор, представленной SEQ ID NO: 62. В некоторых вариантах

осуществления промотор представляет собой последовательность эндогенной конструкции энхансер-промотор SYN1 человека, содержащуюся в SEQ ID NO: 62.

[0400] Иллюстративная конструкция энхансер-промотор SYN1 человека (SEQ ID NO: 62)

TGCGTATGAGTGCAAGTGGGTTTTAGGACCAGGATGAGGCGGGGTGGGGGTGCCTA
CCTGACGACCGACCCCGACCCACTGGACAAGCACCCAACCCCATTCCCCAAATTGC
GCATCCCCTATCAGAGAGGGGGAGGGGAAACAGGATGCGGCGAGGCGCGTGCGCA
CTGCCAGCTTCAGCACCGCGGACAGTGCCTTCGCCCCGCCTGGCGGGCGCGGCCAC
CGCCGCCTCAGCACTGAAGGCGCGCTGACGTCCTCGCCGGTCCCCGCAAACCTCCC
CTTCCCGGCCACCTTGGTCGCGTCCGCGCCGCCGGCCCAGCCGGACCGCACCCAC
GCGAGGCGCGAGATAGGGGGGCACGGGCGCGACCATCTGCGCTGCGGGCGCCGGCG
ACTCAGCGCTGCCTCAGTCTGCGGTGGGCAGCGGAGGAGTCGTGTCGTGCCTGAGA
GCGCAGTCGAGAA

[0401] В определенных вариантах осуществления промотор представляет собой конструкцию энхансер-промотор GFAP человека, как указано в SEQ ID NO: 63. В некоторых вариантах осуществления последовательность конструкции энхансер-промотор по меньшей мере на 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентична последовательности конструкции энхансер-промотор, представленной SEQ ID NO: 63. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой последовательность эндогенной конструкции энхансер-промотор GFAP человека, содержащуюся в SEQ ID NO: 63.

[0402] Иллюстративная конструкция энхансер-промотор GFAP человека (SEQ ID NO: 63)

CCCACCTCCCTCTGTGCTGGGACTCACAGAGGGAGACCTCAGGAGGCAGTCTGTC
CATCACATGTCCAAATGCAGAGCATAACCCTGGGCTGGGCGCAGTGGCGCACAACTG
TAATTCCAGCACTTTGGGAGGCTGATGTGGAAGGATCACTTGAGCCCAGAAGTTCTA
GACCAGCCTGGGCAACATGGCAAGACCCTATCTCTACAAAAAAAGTTAAAAAATCA
GCCACGTGTGGTGACACACACCTGTAGTCCCAGCTATTCAGGAGGCTGAGGTGAGG
GGATCACTTAAGGCTGGGAGGTTGAGGCTGCAGTGAGTCGTGGTTGCGCCACTGCA
CTCCAGCCTGGGCAACAGTGAGACCCTGTCTCAAAAGACAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAGAACATATCCTGGTGTGGAGTAGGGGACGCTGCTCTGACAGAGGCTCGG
GGGCCTGAGCTGGCTCTGTGAGCTGGGGAGGAGGCAGACAGCCAGGCCTTGTCTGC
AAGCAGACCTGGCAGCATTGGGCTGGCCGCCCCCAGGGCCTCCTCTTCATGCCCAG
TGAATGACTCACCTTGGCACAGACACAATGTTGCGGGGTGGGCACAGTGCCTGCTTCC

CGCCGCACCCCAGCCCCCTCAAATGCCTTCCGAGAAGCCCATTGAGCAGGGGGCTT
GCATTGCACCCCAGCCTGACAGCCTGGCATCTTGGGATAAAAGCAGCACAGCCCC
TAGGGGCTGCCCTTGCTGTGTGGCGCCACCGGCGGTGGAGAACAAGGCTCTATTCA
GCCTGTGCCAGGAAAGGGGATCAGGGGATGCCAGGCATGGACAGTGGGTGGCA
GGGGGGGAGAGGAGGGCTGTCTGCTTCCCAGAAGTCCAAGGACACAAATGGGTGA
GGGACTGGGCAGGGTTCTGACCCTGTGGGACCAGAGTGGAGGGCGTAGATGGACC
TGAAGTCTCCAGGGACAACAGGGCCCAGGTCTCAGGCTCCTAGTTGGGCCCAGTGG
CTCCAGCGTTTCCAAACCCATCCATCCCCAGAGGTTCTTCCCATCTCTCCAGGCTGAT
GTGTGGGAACCTCGAGGAAATAAATCTCCAGTGGGAGACGGAGGGGTGGCCAGGGA
AACGGGGCGCTGCAGGAATAAAGACGAGCCAGCACAGCCAGCTCATGTGTAACGGC
TTTGTGGAGCTGTCAAGGCCTGGTCTCTGGGAGAGAGGCACAGGGAGGCCAGACAA
GGAAGGGGTGACCTGGAGGGACAGATCCAGGGGCTAAAGTCCTGATAAGGCAAGA
GAGTGCCGGCCCCCTCTTGCCCTATCAGGACCTCCACTGCCACATAGAGGCCATGAT
TGACCCTTAGACAAAGGGCTGGTGTCCAATCCCAGCCCCCAGCCCCAGAACTCCAG
GGAATGAATGGGCAGAGAGCAGGAATGTGGGACATCTGTGTTCAAGGGAAGGACTC
CAGGAGTCTGCTGGGAATGAGGCCTAGTAGGAAATGAGGTGGCCCTTGAGGGTACA
GAACAGGTTCAATTCTTCGCCAAATTCCCAGCACCTTGCAGGCACTTACAGCTGAGTG
AGATAATGCCTGGGTTATGAAATCAAAAAGTTGGAAAGCAGGTCAGAGGTCATCTG
GTACAGCCCTTCCTTCCCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGTGAGACAAGGTCTCTCTGTT
GCCCAGGCTGGAGTGGCGCAAACACAGCTCACTGCAGCCTCAACCTACTGGGCTCA
AGCAATCCTCCAGCCTCAGCCTCCCAAAGTGCTGGGATTACAAGCATGAGCCACCCC
ACTCAGCCCTTTCCTTCCCTTTTTAATTGATGCATAATAATTGTAAGTATTCATCATGG
TCCAACCAACCCTTCTTGACCCACCTTCTAGAGAGAGGGTCCCTCTTGCTTCAGCG
GTCAGGGCCCCAGACCCATGGTCTGGCTCCAGGTACCACCTGCCTCATGCAGGAGTT
GGCGTGCCAGGAAGCTCTGCCTCTGGGCACAGTGACCTCAGTGGGGTGAGGGGAG
CTCTCCCCATAGCTGGGCTGCGGCCCAACCCACCCCTCAGGCTATGCCAGGGGGT
GTTGCCAGGGGCACCCGGGCATCGCCAGTCTAGCCACTCCTTCATAAAGCCCTCGC
ATCCCAGGAGCGAGCAGAGCCAGAGCAGGTTGGAGAGGAGACGCATCACCTCCGCT
GCTCGC

Энхансеры

[0403] В некоторых случаях конструкция может содержать последовательность энхансера. Термин «энхансер» относится к нуклеотидной последовательности, которая может повышать уровень транскрипции нуклеиновой кислоты, кодирующей представляющей интерес белок (например, анти-VEGF белок). Последовательности

энхансеров (как правило, длиной 50-1500 тысяч пар оснований), как правило, повышают уровень транскрипции, обеспечивая дополнительные сайты связывания для белков, связанных с транскрипцией (например, факторов транскрипции). В некоторых вариантах осуществления последовательность энхансера находится в последовательности интрона. В отличие от последовательностей промоторов, последовательности энхансеров могут действовать на гораздо большем расстоянии от сайта начала транскрипции (например, по сравнению с промотором). Неограничивающие примеры энхансеров включают энхансер RSV, энхансер CMV и/или энхансер SV40. В некоторых вариантах осуществления конструкция содержит энхансер CMV, примером которого является SEQ ID NO: 64. В некоторых вариантах осуществления последовательность энхансера по меньшей мере на 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентична последовательности энхансера, представленной SEQ ID NO: 64. В некоторых вариантах осуществления энхансер, полученный из SV-40, представляет собой последовательность Т-интрона SV-40, примером которой является SEQ ID NO: 65. В некоторых вариантах осуществления последовательность энхансера по меньшей мере на 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентична последовательности энхансера, представленной SEQ ID NO: 65.

[0404] Иллюстративный энхансер CMV (SEQ ID NO: 64)

GACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATA
GCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGAC
CGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGC
CAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCCCACT
TGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACG
GTAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTACTT
GGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGG

[0405] Иллюстративный синтетический интрон SV-40 (SEQ ID NO: 65)

GGAGTCGCTGCGTTGCCTTCGCCCCGTGCCCGCTCCGCGCCGCCTCGCGCCGCCCG
CCCCGGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCT
CCTCCGGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTAATGACGGCTCGTTTCTTTCTGTGGCTGC
GTGAAAGCCTTAAAGGGCTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGGAGCGGCTCGGG
GGGTGCGTGCGTGTGTGTGTGCGTGGGGAGCGCCGCGTGCGGCCCGCGCTGCCCGG
CGGCTGTGAGCGCTGCGGGCGCGGCGCGGGGCTTTGTGCGCTCCGCGTGTGCGCGA
GGGGAGCGCGGCCGGGGGCGGTGCCCGCGGTGCGGGGGGGCTGCGAGGGGAACA
AAGGCTGCGTGCGGGGTGTGTGCGTGGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGCGGC

GGTCGGGCTGTAACCCCCCTGCACCCCCCTCCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCGG
CTTCGGGTGCGGGGCTCCGTGCGGGGCGTGGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGG
GGGTGGCGGCAGGTGGGGGTGCCGGGCGGGGCGGGGCCGCCTCGGGCCGGGGAGG
GCTCGGGGGAGGGGCGCGGGCGCCCCCGGAGCGCCGGCGGGCTGTCGAGGCGCGGC
GAGCCGCAGCCATTGCCTTTTATGGTAATCGTGCGAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTT
GTCCCAAATCTGTGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCGCCGCACCCCCTCTAGCG
GGCGCGGGGCGAAGCGGTGCGGCGCCGGCAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCT
TCGTGCGTCCGCGCCGCGCCGTCCCCTTCTCCCTCTCCAGCCTCGGGGCTGTCCGCG
GGGGACGGCTGCCTTCGGGGGGGACGGGGCAGGGCGGGGTTCGGCTTCTGGCGTG
TGACCGGCGGCTCTAGAGCCTCTGCTAACCATGTTTCATGCCTTCTTCTTTTCTTACA
G

Нетранслируемые области: 5'-UTR и 3'-UTR

[0406] В некоторых вариантах осуществления любая из описанных в данном документе конструкций может включать нетранслируемую область (UTR), такую как 5'-UTR или 3'-UTR. UTR гена транскрибируются, но не транслируются. 5'-UTR начинается с места начала транскрипции и продолжается до стартового кодона, но не включает стартовый кодон. 3'-UTR начинается сразу после стоп-кодона и продолжается до сигнала терминации транскрипции. Регуляторные и/или контрольные признаки UTR могут быть включены в любую из конструкций, композиций, наборов или способов, описанных в данном документе, для усиления или иного модулирования экспрессии анти-VEGF белка.

[0407] Природные 5'-UTR включают последовательность, которая играет роль в инициации трансляции. В некоторых вариантах осуществления 5'-UTR может содержать последовательности, такие как последовательности Козак, которые, как известно, задействованы в процессе, посредством которого рибосома иницирует трансляцию многих генов. Последовательности Козак имеют консенсусную последовательность CCR (A/G) CCAUGG, где R представляет собой пурин (A или G) на три основания выше по ходу транскрипции от стартового кодона (AUG), а за стартовым кодоном следует еще один «G». Также известно, что 5'-UTR образуют вторичные структуры, которые участвуют в связывании фактора элонгации.

[0408] В некоторых вариантах осуществления 5'-UTR включен в любую из конструкций, описанных в данном документе. Неограничивающие примеры 5'-UTR, в том числе из следующих генов: альбумина, сывороточного амилоида А, аполипопротеина А/В/Е, трансферрина, альфа-фетопропротеина, эритропоэтина и фактора VIII, можно

использовать для усиления экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты, такой как мРНК.

[0409] В некоторых вариантах осуществления 5'-UTR от мРНК, которая транскрибируется клеткой в улитке, может быть включена в любую из описанных в данном документе конструкций, композиций, наборов и способов. В некоторых вариантах осуществления 5'-UTR получена из эндогенных локусов гена и может включать всю или часть эндогенной последовательности.

[0410] 3'-UTR обнаруживаются непосредственно на 3'-конце стоп-кодона представляющего интерес гена. В некоторых вариантах осуществления 3'-UTR от мРНК, которая транскрибируется клеткой в улитке, может быть включена в любую из описанных в данном документе конструкций, композиций, наборов и способов. В некоторых вариантах осуществления 3'-UTR получена из эндогенных локусов гена и может включать всю или часть эндогенной последовательности.

[0411] 3'-UTR, как известно, содержат участки аденозинов и уридинов (в форме РНК) или тимидинов (в форме ДНК). Эти богатые AU сигнатуры особенно распространены в генах с высоким уровнем оборота. На основе их особенностей последовательности и функциональных свойств, богатые AU элементы (ARE) можно разделить на три класса (Chen et al., *Mol. Cell. Biol.* 15:5777-5788, 1995; Chen et al., *Mol. Cell Biol.* 15:2010-2018, 1995, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки): ARE класса I содержат несколько рассеянных копий мотива AUUUA в областях, богатых U. Например, мРНК с-Мус и MyoD содержат ARE класса I. ARE класса II имеют два или более перекрывающихся нонамеров UUAUUUA (U/A) (U/A). мРНК ГМ-КСФ и ФНО-альфа являются примерами, которые содержат ARE класса II. ARE класса III менее четко определены. Эти богатые U области не содержат мотива AUUUA, двумя хорошо изученными примерами этого класса являются мРНК с-Jun и миогенина.

[0412] Известно, что большинство белков, связывающихся с ARE, дестабилизируют мессенджер, тогда как члены семейства ELAV, в первую очередь HuR, были задокументированы как повышающие стабильность мРНК. HuR связывается с ARE всех трех классов. Конструирование сайтов связывания, специфичных для HuR, в 3'-UTR молекул нуклеиновых кислот приведет к связыванию HuR и, таким образом, стабилизации сообщения *in vivo*.

[0413] В некоторых вариантах осуществления введение, удаление или модификация ARE 3'-UTR может использоваться для модуляции стабильности мРНК, кодирующей анти-VEGF белок. В других вариантах осуществления ARE могут быть удалены или мутированы

для повышения внутриклеточной стабильности и, таким образом, увеличения трансляции и продукции анти-VEGF белка.

[0414] В других вариантах осуществления последовательности, не являющиеся ARE, могут быть включены в 5'- или 3'-UTR. В некоторых вариантах осуществления интроны или части интронных последовательностей могут быть включены во фланкирующие области полинуклеотидов в любом из конструкций, наборов и способов, представленных в данном документе. Включение интронных последовательностей может увеличивать продукцию белка, а также уровни мРНК.

Внутренние сайты посадки рибосомы (IRES)

[0415] В некоторых вариантах осуществления конструкция, кодирующая анти-VEGF белок, может включать внутренний сайт посадки рибосомы (IRES). IRES образует формирует сложную вторичную структуру, которая позволяет инициировать трансляцию из любого положения с мРНК, расположенной непосредственно ниже по ходу трансляции от того места, где находится IRES (см., например, Pelletier and Sonenberg, *Mol. Cell. Biol.*, 8(3):1103-1112 (1988), полностью включена в данный документ посредством ссылки.

[0416] Специалистам в данной области техники известно несколько последовательностей IRES, включая последовательности, например, из вируса ящура (FMDV), вируса энцефаломиокардита (EMCV), риновируса человека (HRV), вируса паралича свержка, вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), вируса гепатита А (HAV), вируса гепатита С (HCV) и полиовируса (PV). См., например, Alberts, *Molecular Biology of the Cell*, Garland Science, 2002; и Hellen et al., *Genes Dev.* 15(13):1593-612, 2001, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки.

[0417] В некоторых вариантах осуществления последовательность IRES, включенная в конструкцию, которая кодирует анти-VEGF белок или С-концевую часть анти-VEGF белка, представляет собой последовательность 2А вируса ящура (FMDV). Последовательность вируса ящура 2А представляет собой небольшой пептид (приблизительно 18 аминокислот в длину), который, как было показано, опосредует расщепление полипротеинов (Ryan, MD et al., *EMBO* 4:928-933, 1994; Mattion et al., *J Virology* 70:8124-8127, 1996; Furler et al., *Gene Therapy* 8:864-873, 2001; и Halpin et al., *Plant Journal* 4:453-459, 1999, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки). Активность расщепления последовательности 2А ранее была продемонстрирована в искусственных системах, включая плазмиды и конструкции для генной терапии (AAV и ретровирусы) (Ryan et al., *EMBO* 4:928-933, 1994; Mattion et al., *J Virology* 70:8124-8127, 1996; Furler et al., *Gene*

Therapy 8:864-873, 2001; and Halpin et al., Plant Journal 4:453-459, 1999; de Felipe et al., Gene Therapy 6:198-208, 1999; de Felipe et al., Human Gene Therapy I I: 1921-1931, 2000; и Klump et al., Gene Therapy 8:811-817, 2001, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки).

[0418] IRES может быть использован в конструкции гAAV. В некоторых вариантах осуществления конструкция, кодирующая С-концевую часть анти-VEGF белка может включать полинуклеотидный внутренний участок посадки рибосомы (IRES). В некоторых вариантах осуществления IRES может быть частью композиции, включающей более одной конструкции. В некоторых вариантах осуществления IRES используется для получения более одного полипептида из одного транскрипта гена.

Сигналы секреции и расщепления

[0419] В некоторых вариантах осуществления любая из предложенных в данном документе конструкций может включать сигналы секреции, сайты расщепления и/или линкерные последовательности. В некоторых вариантах осуществления эти сайты являются функциональными в транслируемом белке и приводят к посттрансляционным модификациям и/или событиям процессинга. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе конструкции транслируются в относительно длинный полипептид-предшественник, такой полипептид-предшественник может затем подвергаться посттрансляционным модификациям и/или процессингу, который может включать эндогенный клеточный фермент. На такой стадии процессинга может быть получено несколько пептидов, биологическая функция таких пептидов может выполняться либо исключительно одним пептидом, либо функцией нескольких пептидов, действующих совместно.

[0420] В некоторых вариантах осуществления предложенные в данном документе конструкции включают сигнальный пептид. В некоторых вариантах осуществления сигнальный пептид может представлять собой сигнальную последовательность, нацеливающий сигнал, сигнал локализации, последовательность локализации, транзитный пептид, лидерную последовательность или лидерный пептид. В некоторых вариантах осуществления такая последовательность обычно является короткой (например, длиной приблизительно 16-30 аминокислот). В некоторых вариантах осуществления такой сигнальный пептид присутствует на N-конце представляющего интерес пептида. В некоторых вариантах осуществления в продукте трансляции может существовать более одного сигнального пептида. В некоторых вариантах осуществления иллюстративный

сигнальный пептид содержит сигнал секреции интерлейкина-2 (IL2SS). В некоторых вариантах осуществления иллюстративный сигнальный пептид кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 66 или 67. В некоторых вариантах осуществления такая аминокислотная последовательность представлена SEQ ID NO: 68 и может быть на 95%, 90%, 85%, 80% или 75% идентична такой последовательности. Специалисту в данной области будет понятно, что существуют альтернативные сигнальные последовательности секреции, и они могут быть включены в конструкции, как описано в данном документе.

[0421] В некоторых вариантах осуществления конструкции, представленные в данном документе, включают линкерный пептид. В некоторых вариантах осуществления линкерный пептид используется для соединения двух или более функциональных пептидов в продукте трансляции. В некоторых вариантах осуществления такой линкерный пептид может включать дополнительные функциональные последовательности, такие как последовательности распознавания для эндогенных пептидаз. В некоторых вариантах осуществления такая линкерная последовательность содержит сигнал расщепления фурином. В некоторых вариантах осуществления иллюстративная линкерная последовательность, содержащая сигнал расщепления фурином, кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 71. В некоторых вариантах осуществления такая линкерная последовательность содержит сигнал расщепления фурином и может быть представлена SEQ ID NO: 72 или может быть приблизительно на 90%, 80%, 70% или 60% сходной с такой последовательностью. В некоторых вариантах осуществления последовательность линкерного пептида может иметь длину, составляющую одну аминокислоту, две аминокислоты, три аминокислоты, четыре аминокислоты, пять аминокислот, шесть аминокислот, семь аминокислот, восемь аминокислот, девять аминокислот, десять аминокислот, одиннадцать аминокислот, двенадцать аминокислот, тринадцать аминокислот, четырнадцать аминокислот, пятнадцать аминокислот, шестнадцать аминокислот, семнадцать аминокислот, восемнадцать аминокислот, девятнадцать аминокислот или двадцать аминокислот. В некоторых вариантах осуществления последовательность линкерного пептида может иметь длину до пятидесяти аминокислот. Специалисту в данной области будет понятно, что существуют альтернативные линкерные последовательности (функциональные или нет), и они могут быть включены в конструкции, как описано в данном документе.

[0422] В некоторых вариантах осуществления предложенные в данном документе конструкции включают пептидную последовательность, которая индуцирует расщепление

полипептида и/или неспособность образовывать пептидную связь во время трансляции. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе конструкции могут включать саморасщепляющийся пептид, который в некоторых вариантах осуществления может представлять собой саморасщепляющийся пептид 2А. В некоторых вариантах осуществления такой пептид имеет длину, составляющую приблизительно от 18 до 22 аминокислот, например, 18 аминокислот, 19 аминокислот, 20 аминокислот, 21 аминокислоту или 22 аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления такой пептид может индуцировать пропуск рибосом во время трансляции белка. В некоторых вариантах осуществления саморасщепляющийся пептид 2А представлен мотивом центральной последовательности DxExNPGP (SEQ ID NO: 115) и эндогенно обнаруживается в ряде семейств вирусов. В некоторых вариантах осуществления саморасщепляющийся пептид генерирует полипротеины из одного транскрипта, заставляя рибосому не образовывать пептидную связь. В некоторых вариантах осуществления сигнал саморасщепления и/или расщепления кодируется последовательностью нуклеотидов, представленной SEQ ID NO: 69. В некоторых вариантах осуществления изобретения сигнал саморасщепления и/или расщепления представлен SEQ ID NO: 70 или последовательностью, имеющей приблизительно 95%, 90%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55% или 50% идентичности. Специалисту в данной области будет понятно, что существуют альтернативные последовательности расщепления пептида (саморасщепляющиеся или требующие помощи эндогенного клеточного механизма), и они могут быть включены в конструкции, как описано в данном документе.

[0423] Иллюстративная нуклеотидная последовательность сигнальной секреции (SEQ ID NO: 66)

ATGTACCGGATGCAGCTGCTGAGCTGTATCGCCCTGTCTCTGGCCCTGGTCACCAAT
TCT

[0424] Иллюстративная нуклеотидная последовательность сигнальной секреции (SEQ ID NO: 67)

ATGTATAGAATGCAGCTCCTGTCCTGCATTGCCCTGAGCCTGGCTCTCGTGACCAAC
AGC

[0425] Иллюстративная аминокислотная последовательность сигнальной секреции (SEQ ID NO: 68)

MYRMQLLSCIALSLALVTNS

[0426] Иллюстративная нуклеотидная последовательность сигнала расщепления (SEQ ID NO: 69)

GGCTCTGGCGAAGGCAGAGGCAGCCTGCTTACATGTGGCGACGTGGAAGAGAACCC
CGGACCT

[0427] Иллюстративная аминокислотная последовательность сигнала расщепления (SEQ ID NO: 70)

GSGEGRGSLTTCGDVEENPGP

[0428] Иллюстративная нуклеотидная последовательность линкера/сигнала расщепления (SEQ ID NO: 71)

GACAAGACCCACACCGGCAAGCGGAAGAGAAGA

[0429] Иллюстративная аминокислотная последовательность линкера/сигнала расщепления (SEQ ID NO: 72)

DKTHTGKRKRR

Сайты сплайсинга

[0430] В некоторых вариантах осуществления любая из представленных в данном документе конструкций может включать последовательности сплайс-донора и/или сплайс-акцептора, которые являются функциональными в ходе процессинга РНК, происходящего во время транскрипции. В некоторых вариантах осуществления сайты сплайсинга вовлечены в транс-сплайсинг.

[0431] Иллюстративный интрон сплайс-донора (SEQ ID NO: 73)

GTAAGTATCAAGGTTACAAGACAGGTTTAAGGAGACCAATAGAAACTGGGCTTGTC
GAGACAGAGAAGACTCTTGCGTTTCT

[0432] Иллюстративный интрон сплайс-акцептора (SEQ ID NO: 74)

GATAGGCACSTATTTGGTCTTACTGACATCCACTTTGCSTTTCTCTCCACAG

Последовательности полиаденилирования

[0433] В некоторых вариантах осуществления конструкция, представленная в данном документе, может содержать сигнальную последовательность полиаденилирования (поли(А)). Большинство зарождающихся эукариотических мРНК имеют поли(А)-хвост на своем 3'-конце, который добавляется во время сложного процесса, который включает расщепление первичного транскрипта и реакцию связанного полиаденилирования,

вызванную сигнальной последовательностью поли(А) (см., например, Proudfoot et al., Cell 108:501-512, 2002, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки). Поли(А)-хвост придает мРНК стабильность и транспортируемость (Molecular Biology of the Cell, Third Edition by B. Alberts et al., Garland Publishing, 1994, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки). В некоторых вариантах осуществления сигнальная последовательность поли(А) расположена на 3'-конце от кодирующей последовательности.

[0434] Используемый в данном документе термин «полиаденилирование» относится к ковалентной связи полиаденилового фрагмента или его модифицированного варианта с молекулой матричной РНК. У эукариот большинство молекул матричной РНК (мРНК) являются полиаденилированными на 3'-конце. 3'-поли(А)-хвост представляет собой длинную последовательность адениновых нуклеотидов (например, 50, 60, 70, 100, 200, 500, 1000, 2000, 3000, 4000 или 5000) (SEQ ID NO: 117), добавленных к пре-мРНК посредством действия фермента полиаденилат-полимеразы. В некоторых вариантах осуществления поли(А)-хвост добавляется к транскриптам, содержащим определенную последовательность, например, поли(А)-сигнал. Поли(А)-хвост и связанные с ним белки помогают защитить мРНК от деградации экзонуклеазами. Полиаденилирование также играет определенную роль в терминации транскрипции, экспорте мРНК из ядра и трансляции. Полиаденилирование, как правило, происходит в ядре непосредственно после транскрипции ДНК в РНК, однако может также происходить позже в цитоплазме. После окончания транскрипции цепь мРНК расщепляется действием комплекса эндонуклеазы, связанного с РНК-полимеразой. Участок расщепления, как правило, характеризуется присутствием последовательности оснований AAUAAA возле участка расщепления. После расщепления мРНК аденозиновые остатки добавляют к свободному 3'-концу на участке расщепления.

[0435] Используемый в данном документе термин «сигнальная последовательность поли(А)» или «сигнальная последовательность полиаденилирования» представляет собой последовательность, которая запускает эндонуклеазное расщепление мРНК и добавление ряда аденозинов к 3'-концу расщепленной мРНК.

[0436] Существует несколько сигнальных последовательностей поли(А), которые можно использовать, в том числе полученные из бычьего гормона роста (bGH) (Woychik et al., Proc. Natl. Acad. Sci. US.A. 81(13):3944-3948, 1984; патент США №5 122 458, каждый из которых полностью включен в данный документ посредством ссылки), β-глобина мыши, α-глобина мыши (Orkin et al., EMBO J 4(2):453-456, 1985; Thein et al., Blood 71(2):313-319,

1988, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки), коллагена человека, вируса полиомы (Batt et al., *Mol. Cell Biol.* 15(9):4783-4790, 1995, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки), гена тимидинкиназы вируса простого герпеса (HSV TK), сигнала полиаденилирования гена тяжелой цепи IgG (US 2006/0040354, который полностью включен в данный документ посредством ссылки), гормона роста человека (hGH) (Szymanski et al., *Mol. Therapy* 15(7):1340-1347, 2007, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки), группы, состоящей из сайта поли(A) SV40, такого как позднего и раннего сайта поли(A) SV40 (Schek et al., *Mol. Cell Biol.* 12(12):5386-5393, 1992, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки).

[0437] Сигнальная последовательность поли(A) может представлять собой ААТAAA. Последовательность ААТAAA может быть замещена другими гексануклеотидными последовательностями, гомологичными ААТAAA и способными сигнализировать полиаденилирование, включая АТТAAA, АГТAAA, САТAAA, ТАТAAA, ГАТAAA, АСТAAA, ААТАТА, ААГAAA, ААТААТ, АААААА, ААТГАА, ААТСАА, ААСAAA, ААТСАА, ААТААС, ААТАГА, ААТТАА или ААТААГ (см., например, WO 06/12414, который полностью включен в данный документ посредством ссылки).

[0438] В некоторых вариантах осуществления сигнальная последовательность поли(A) может быть синтетическим сайтом полиаденилирования (см., например, конструкцию для экспрессии pCl-neo Promega, которая основана на публикации Levitt et al, *Genes Dev.* 3(7):1019-1025, 1989, полностью включенной в данный документ посредством ссылки). В некоторых вариантах осуществления сигнальная последовательность поли(A) представляет собой сигнал полиаденилирования растворимого нейропиллина-1 (sNRP) (АААТААААТАСГАААТГ) (SEQ ID NO: 116) (см., например, WO 05/073384, который полностью включен в данный документ посредством ссылки). В некоторых вариантах осуществления сигнальная последовательность поли(A) содержит сайт поли(A) SV40 или состоит из него. В некоторых вариантах осуществления сигнал поли(A) содержит или состоит из SEQ ID NO: 76. В некоторых вариантах осуществления сигнальная последовательность поли(A) содержит или состоит из bGHpA. В некоторых вариантах осуществления сигнал поли(A) содержит или состоит из SEQ ID NO: 75. Дополнительные примеры сигнальных последовательностей поли(A) известны в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления последовательность поли(A) по меньшей мере на 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентична последовательности поли(A), представленной SEQ ID NO: 75 или 76.

[0439] Иллюстративная сигнальная последовательность поли(A) bGH (SEQ ID NO: 75)

CTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGAC
CCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCTTTTCCATAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCA
TTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGG
GGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGGCTCTATGG

[0440] Иллюстративная сигнальная последовательность поли(A) SV40 (SEQ ID NO: 76)

AACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTC
ACAAATAAAGCATTTTTTTCCTGCTATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAACTCATCAATG
TATCTTA

Дополнительные последовательности

[0441] В некоторых вариантах осуществления конструкции по настоящему изобретению могут включать один или более сайтов клонирования. В некоторых таких вариантах осуществления сайты клонирования могут быть удалены не полностью перед изготовлением для введения субъекту. В некоторых вариантах осуществления сайты клонирования могут играть функциональную роль, включая роль линкерных последовательностей, сигналов расщепления нуклеотидов и/или пептидов и/или частей сайта Козак. Как будет понятно специалистам в данной области техники, сайты клонирования могут значительно различаться по первичной последовательности, сохраняя при этом желаемую функцию. В некоторых вариантах осуществления конструкции могут содержать любую комбинацию сайтов клонирования, иллюстративные сайты клонирования представлены SEQ ID NO: 77-82.

[0442] Иллюстративный сайт клонирования A (SEQ ID NO: 77)

TTGTCGACGCGGCCGCACGCGT

[0443] Иллюстративный сайт клонирования B (SEQ ID NO: 78)

CTCCTGGGCAACGTGCTGGTTATTGTGACCGGTGCCACC

[0444] Иллюстративный сайт клонирования C (SEQ ID NO: 79)

TAAGAGCTCGCTGATCAGCCTCGA

[0445] Иллюстративный сайт клонирования D (SEQ ID NO: 80)

AAGCTTGAATTCAGCTGACGTGCCTCGGACCGCCTAGG

[0446] Иллюстративный сайт клонирования E (SEQ ID NO: 81)

GCGGCCGCACGCGT

[0447] Иллюстративный сайт клонирования F (SEQ ID NO: 82)

AAGCTTGAATTCAGCTGACGTGCCTCGGACCGCT

Домены дестабилизации

[0448] В некоторых вариантах осуществления любая из представленных в данном документе конструкций может необязательно включать последовательность, кодирующую дестабилизирующий домен («дестабилизирующая последовательность») для временного контроля экспрессии белка. Неограничивающие примеры дестабилизирующих последовательностей включают последовательности, кодирующие последовательность FK506, последовательность дигидрофолатредуктазы (DHFR) или другие иллюстративные дестабилизирующие последовательности.

[0449] В отсутствие стабилизирующего лиганда белковая последовательность, функционально связанная с дестабилизирующей последовательностью, расщепляется путем убиквитинирования. Напротив, в присутствии стабилизирующего лиганда деградация белка ингибируется, тем самым обеспечивая активную экспрессию белковой последовательности, функционально связанной с дестабилизирующей последовательностью. В качестве положительного контроля для стабилизации экспрессии белка экспрессия белка может быть обнаружена обычными способами, включая ферментативные, рентгенографические, колориметрические, флуоресцентные или другие спектрографические анализы; анализы сортировки флуоресцентно активируемых клеток (FACS); иммунологические анализы (например, иммуноферментный анализ (ИФА), радиоиммуноанализ (RIA) и иммуногистохимию).

[0450] Дополнительные примеры дестабилизирующих последовательностей известны в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления дестабилизирующая последовательность представляет собой последовательность белка, связывающего FK506 и рапамицин (FKBP12), а стабилизирующий лиганд представляет собой Shield-1 (Shld1) (Banaszynski et al. (2012) Cell 126(5): 995-1004, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки). В некоторых вариантах осуществления дестабилизирующая последовательность представляет собой последовательность DHFR, а стабилизирующий лиганд представляет собой триметоприм (TMP) (Iwamoto et al. (2010) Chem Biol 17:981-988, которая полностью включена в данный документ посредством

ссылки).

[0451] В некоторых вариантах осуществления дестабилизирующая последовательность представляет собой последовательность FKBP12, и присутствие конструкции гAAV, несущей ген FKBP12, в клетке субъекта (например, поддерживающей наружной волосковой клетке улитки) выявляют с помощью вестерн-блоттинга. В некоторых вариантах осуществления дестабилизирующую последовательность можно использовать для проверки временно специфичной активности любой из описанных в данном документе конструкций гAAV.

[0452] Иллюстративная аминокислотная последовательность, дестабилизирующая DHFR (SEQ ID NO: 83)

MISLIAALAVDYVIGMENAMPWNLPADLAWFKRNTLNKPVIMGRHTWESIGRPLPGRK
NIILSSQPSTDDRVTWVKSVDIAAACGDVPEIMVIGGGRVIEQFLPKAQKLYLTHIDAE
VEGDTHFPDYEPDDWESVDFSEFHDADAQNSHSYCFEILERR

[0453] Иллюстративная нуклеотидная последовательность, дестабилизирующая DHFR (SEQ ID NO: 84)

GGTACCATCAGTCTGATTGCGGCGTTAGCGGTAGATTACGTTATCGGCATGGAAAAC
GCCATGCCGTGGAACCTGCCTGCCGATCTCGCCTGGTTTAAACGCAACACCTTAAAT
AAACCCGTGATTATGGGCCGCCATACCTGGGAATCAATCGGTCGTCCGTTGCCAGGA
CGCAAAAATATTATCCTCAGCAGTCAACCGAGTACGGACGATCGCGTAACGTGGGT
GAAGTCGGTGGATGAAGCCATCGCGGCGTGTGGTGACGTACCAGAAATCATGGTGA
TTGGCGGCGGTTCGCGTTATTGAACAGTTCTTGCCAAAAGCGCAAAAACCTGTATCTGA
CGCATATCGACGCAGAAGTGGAAGGCGACACCCATTTCCCGGATTACGAGCCGGAT
GACTGGGAATCGGTATTCAGCGAATTCACGATGCTGATGCGCAGAACTCTCACAG
CTATTGCTTTGAGATTCTGGAGCGGCGATAA

[0454] Иллюстративный дестабилизирующий домен (SEQ ID NO: 85)

ATCAGTCTGATTGCGGCGTTAGCGGTAGATTACGTTATCGGCATGGAAAACGCCATG
CCGTGGAACCTGCCTGCCGATCTCGCCTGGTTTAAACGCAACACCTTAAATAAACCC
GTGATTATGGGCCGCCATACCTGGGAATCAATCGGTCGTCCGTTGCCAGGACGCAA
AAATATTATCCTCAGCAGTCAACCGAGTACGGACGATCGCGTAACGTGGGTGAAGT
CGGTGGATGAAGCCATCGCGGCGTGTGGTGACGTACCAGAAATCATGGTGAATTGGC
GGCGGTCGCGTTATTGAACAGTTCTTGCCAAAAGCGCAAAAACCTGTATCTGACGCAT
ATCGACGCAGAAGTGGAAGGCGACACCCATTTCCCGGATTACGAGCCGGATGACTG

GGAATCGGTATTCAGCGAATTCACGATGCTGATGCGCAGAACTCTCACAGCTATTG
CTTTGAGATTCTGGAGCGGCGA

[0455] Иллюстративная аминокислотная последовательность, дестабилизирующая FKBP12 (SEQ ID NO: 86)

MGVEKQVIRPGNGPKPAPGQTVTVHCTGFGKDGDL SQKFWSTKDEGQKPFQIGKGA
VIKGWDEGVIGMQIGEVARLRCS SDYAYGAGGFPAWGIQPNSVLD FEIEVLSVQ

Репортерные последовательности или элементы

[0456] В некоторых вариантах осуществления предложенные в данном документе конструкции могут необязательно включать последовательность, кодирующую репортерный полипептид и/или белок («репортерная последовательность»). Неограничивающие примеры репортерных последовательностей включают последовательности ДНК, кодирующие: бета-лактамазу, бета-галактозидазу (LacZ), щелочную фосфатазу, тимидинкиназу, зеленый флуоресцентный белок (GFP), красный флуоресцентный белок, флуоресцентный белок mCherry, желтый флуоресцентный белок, хлорамфениколацетилтрансферазу (CAT) и люциферазу. Дополнительные примеры репортерных последовательностей известны в данной области техники. При связывании с элементами контроля, которые управляют их экспрессией, репортерная последовательность может обеспечивать сигналы, обнаруживаемые обычными способами, включая ферментативный, рентгенографический, колориметрический, флуоресцентный или другие спектрографические исследования; анализы сортировки флуоресцентно активируемых клеток (FACS); иммунологические анализы (например, иммуноферментный анализ (ИФА), радиоиммуноанализ (RIA) и иммуногистохимию).

[0457] В некоторых вариантах осуществления репортерная последовательность представляет собой ген LacZ, и присутствие конструкции, несущей ген LacZ, в клетке млекопитающего (например, волосковой клетке улитки) определяется с помощью анализов на активность бета-галактозидазы. Когда репортер представляет собой флуоресцентный белок (например, зеленый флуоресцентный белок) или люциферазу, присутствие конструкции, несущей флуоресцентный белок или люциферазу, в клетке млекопитающего (например, волосковой клетки улитки) может быть измерено флуоресцентными методами (например, флуоресцентной микроскопией или FACS) или продуцирование света в люминометре (например, спектрофотометре или приборе для визуализации IVIS). В некоторых вариантах осуществления репортерную последовательность можно использовать для проверки способности к нацеливанию на тканевую специфичность и

регуляторную и/или контрольную активность тканеспецифичного промотора любой из конструкций, описанных в данном документе.

[0458] В некоторых вариантах осуществления репортерная последовательность представляет собой метку FLAG (например, метку 3xFLAG) и присутствие конструкции, несущей метку FLAG, в клетке млекопитающего (например, клетке внутреннего уха, например, волоске улитки или поддерживающей клетке) выявляется с помощью анализов связывания с белками или обнаружения (например, вестерн-блоттинга, иммуногистохимии, радиоиммуноанализа (РИА), масс-спектрометрии). Иллюстративная последовательность метки 3xFLAG представлена как SEQ ID NO: 87.

[0459] В некоторых вариантах осуществления репортерная последовательность представляет собой метку усиленного зеленого флуоресцентного белка (eGFP) (например, метку eGFP) и присутствие конструкции, несущей метку eGFP, в клетке млекопитающего (например, клетке внутреннего уха, например, волоске улитки или поддерживающей клетке) обнаруживают с помощью флуоресценции, анализов связывания с белками или анализами обнаружения (например, вестерн-блоттинга, иммуногистохимии, радиоиммуноанализа (РИА), масс-спектрометрии). Иллюстративная последовательность метки eGFP представлена как SEQ ID NO: 104 и 105.

[0460] Иллюстративная последовательность метки 3xFLAG (SEQ ID NO: 87)

GGATCCCGGGCTGACTACAAAGACCATGACGGTGATTATAAAGATCATGACATCGA
CTACAAGGATGACGATGACAAG

[0461] Иллюстративная нуклеотидная последовательность усиленного зеленого флуоресцентного белка (eGFP) (SEQ ID NO: 104)

MVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTCLKFICTTGKLPVWP
TLVTTLTYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEG
DTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGS
VQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLGM
DELYK

[0462] Иллюстративная аминокислотная последовательность усиленного зеленого флуоресцентного белка (eGFP) (SEQ ID NO: 105)

ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTTCGAGCT
GGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGAT
GCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTG

CCCTGGCCCACCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTAC
CCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCCGAAGGCTACGTC
CAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGT
GAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCA
AGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAA
CGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCC
GCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACC
CCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCC
GCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGT
GACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAG

Капсиды AAV

[0463] В настоящем изобретении предложена одна или более полинуклеотидных конструкций, упакованных в капсид AAV. В некоторых вариантах осуществления капсид AAV представляет собой или получен из капсида AAV серотипа AAV2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, rh8, rh10, rh39, rh43 или Anc80 или одного, или более их гибридов. В некоторых вариантах осуществления капсид AAV из предкового серотипа AAV. В некоторых вариантах осуществления капсид AAV представляет собой предковый (Anc) капсид AAV. Капсид Anc создается из последовательности конструкции, построенной с использованием эволюционных вероятностей и эволюционного моделирования для определения вероятной предковой последовательности. Таким образом, известно, что последовательность капсида/конструкции Anc не существует в природе. Например, в некоторых вариантах осуществления капсид AAV представляет собой капсид Anc80 (например, капсид Anc80L65). В некоторых вариантах осуществления капсид AAV создается с использованием матричной кодирующей последовательности нуклеотидов, содержащей SEQ ID NO: 88. В некоторых вариантах осуществления капсид содержит полипептид, представленный SEQ ID NO: 89. В некоторых вариантах осуществления капсид содержит полипептид, последовательность которого по меньшей мере на 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентична полипептиду, представленному SEQ ID NO: 89. В некоторых вариантах осуществления капсид содержит полипептид, представленный SEQ ID NO: 113. В некоторых вариантах осуществления капсид содержит полипептид, последовательность которого по меньшей мере на 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентична полипептиду, представленному SEQ ID NO: 113. В некоторых вариантах осуществления капсид содержит полипептид, представленный SEQ ID NO: 114. В некоторых вариантах осуществления капсид содержит полипептид, последовательность которого по меньшей мере на 85%, 90%,

95%, 98% или 99% идентична полипептиду, представленному SEQ ID NO: 114.

[0464] Как предусмотрено в данном документе, любая комбинация капсидов гAAV и конструкций AAV (например, включающих ITR AAV) может быть использована в рекомбинантных частицах AAV (гAAV) по настоящему изобретению. Например, ITR дикого типа или варианта AAV2 и капсид Anc80, ITR дикого типа или варианта AAV2 и капсид AAV6 и т. д. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения частица AAV состоит из компонентов AAV2 (например, капсид и ITR представляют собой серотип AAV2). В некоторых вариантах осуществления частица AAV представляет собой частицу AAV2/6, AAV2/8 или AAV2/9 (например, капсид AAV6, AAV8 или AAV9 с конструкцией AAV, имеющей ITR AAV2). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения частица AAV представляет собой частицу AAV2/Anc80, которая содержит капсид Anc80 (например, содержащий полипептид SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 113 или SEQ ID NO: 114), который инкапсулирует конструкцию AAV с ITR AAV2 (например, SEQ ID NO: 45 и 46, 47 и 48), фланкирующими часть кодирующей последовательности, например, последовательность, кодирующую анти-VEGF белок (например, SEQ ID NO: 13, 14, 15, 19, 22, 42 и/или 103). Другие частицы AAV известны в данной области техники и описаны, например, в Sharma et al., Brain Res Bull. 2010 Feb 15; 81(2-3): 273, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления последовательность капсида по меньшей мере на 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентична нуклеотидной или аминокислотной последовательности капсида, представленной SEQ ID NO: 88 или 89, соответственно.

[0465] В некоторых вариантах осуществления описанный в данном документе подход к доставке через платформу объединяет библиотеку синтетических капсидов AAV, известных как предковые капсиды AAV (AAVAnc), которые воссоздают эволюционную линию современных встречающихся в природе вирусов. В некоторых вариантах осуществления эти капсиды AAV сочетаются с новой минимально инвазивной процедурой введения для доставки продуктов-кандидатов непосредственно в улитку. В некоторых вариантах осуществления в подходе к доставке используется вариант капсида AAVAnc80 из этой библиотеки (также известный как Anc80L65). В некоторых вариантах осуществления такой капсид используется для создания частицы гAAV, при этом такая частица создается путем добавления конструкции, как описано в данном документе, например, конструкции, содержащей анти-VEGF белок, как описано в данном документе, для создания гAAVAnc80-анти-VEGF. В некоторых вариантах осуществления такая частица может доставлять кДНК для ингибитора VEGF, белка, который может вызывать

аномальный рост кровеносных сосудов. В некоторых вариантах осуществления такое лечение применяется для лечения отологического заболевания, характеризующегося неоваскуляризацией, например, для лечения ВИШ, опухоли преддверно-улиткового нерва, также называемого VIII парой черепных нервов.

[0466] В некоторых вариантах осуществления композиция, раскрытая в данном документе, включает капсид AAVAnc80, который представляет собой рационально разработанный синтетический капсид AAV, последовательность которого была определена путем реконструкции предковой последовательности. Реконструкция предковой последовательности использует доступную информацию о последовательности встречающихся в природе аденоассоциированных вирусов и в результате филогенетического и статистического прогнозирования идентифицирует наследственное состояние последовательности в различных промежуточных эволюционных узлах (**фиг. 9**). Во время создания AAVAnc80 девять узлов были реконструированы, а производные *in silico* последовательности линии AAV были синтезированы *de novo* и охарактеризованы. Это привело к идентификации узла библиотеки Anc80 (Anc80Lib), предполагаемого предка широко изученных AAV серотипов 1, 2, 8 и 9. Последовательности белков Anc80Lib впоследствии были подвергнуты обратной трансляции и получены с помощью генного синтеза, а отдельные клоны были проанализированы в изоляции на предмет упаковки, инфекционности и биологических свойств. В некоторых вариантах осуществления и на основании этих результатов для дальнейшей характеристики был выбран AAVAnc80, 65-й клон Anc80Lib (Anc80L65). Вариант капсида AAVAnc80 имеет отличительный состав; хотя последовательности AAV8 и AAV2 отличаются только примерно на 9% и 12%, соответственно, от AAVAnc80, структурное моделирование AAVAnc80 показало, что около 20% внешней поверхности его частиц отличается от известных циркулирующих AAV (**фиг. 9** и **фиг. 10**) таким образом, что распределяется по всей поверхности капсида (см., например, Zinn 2015, полностью включена в данный документ посредством ссылки).

[0467] В некоторых вариантах осуществления эффективность AAVAnc80 в качестве частиц для генной терапии была охарактеризована *in vivo*, и частицы гAAV, содержащие AAVAnc80, продемонстрировали способность действовать в качестве широко применимой частицы для генной терапии. В некоторых вариантах осуществления исследования, проведенные на мышах и приматах, отличных от человека (NHP), показали, что AAVAnc80 обладает такой же эффективностью трансдукции, что и AAV8, при нацеливании на печень после внутривенной инъекции без явных признаков системной токсичности (см., например, Zinn 2015; Murillo 2019, каждая из которых полностью включена в данный документ

посредством ссылки). Кроме того, в некоторых вариантах осуществления AAVAnc80 продемонстрировал тропизм и эффективную трансдукцию переднего сегмента глаза мыши (Wang 2017, полностью включена в данный документ посредством ссылки), сетчатки мыши и NHP (Zinn 2015; Carvalho 2018, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки), скелетной мышцы мыши (Zinn 2015, полностью включена в данный документ посредством ссылки), центральной нервной системы (ЦНС) мыши путем системной и интрапаренхиматозной доставки (Hudry 2018, полностью включена в данный документ посредством ссылки) и почки мыши (Ikeda 2018, полностью включена в данный документ посредством ссылки).

[0468] В некоторых вариантах осуществления композиции, как описано в данном документе (например, содержащие rAAV-анти-VEGF), содержат капсид AAVAnc80. В некоторых вариантах осуществления капсид AAVAnc80 демонстрирует высокую эффективность трансдукции в отношении кохлеарных и вестибулярных клеток. AAVAnc80 представляет собой рационально сконструированный капсид AAV, последовательность которого была установлена путем реконструкции предковой последовательности (Zinn 2015, полностью включена в данный документ посредством ссылки). Реконструкция предковой последовательности использует доступную информацию о последовательности встречающихся в природе AAV в и в результате филогенетического и статистического прогнозирования идентифицирует наследственное состояние последовательности в различных промежуточных эволюционных узлах. Как описано в литературе, синтез *de novo* и характеристика полученных *in silico* последовательностей линии AAV привели к идентификации узла библиотеки Anc80 (Anc80Lib), предполагаемого предка широко изученных серотипов AAV 1, 2, 8 и 9. Последующая оценка последовательностей Anc80Lib привела к дальнейшей характеристике AAVAnc80, 65-го клона Anc80Lib (Anc80L65). Эти исследования показали, что вариант капсида AAVAnc80 имеет отличительный состав с расходящимся распределением частиц по внешней поверхности, что дает стабильный и функциональный вариант AAV с такой же эффективностью трансдукции, как и в случае AAV8 (Zinn 2015, полностью включена в данный документ посредством ссылки). Первое сообщение об использовании AAVAnc80 во внутреннем ухе млекопитающих показало высокую эффективность трансдукции в кохлеарных и вестибулярных волосковых клетках (Landegger 2017, полностью включена в данный документ посредством ссылки). Многочисленные последующие независимые исследования подтвердили повышенную эффективность трансдукции кохлеарных и вестибулярных клеток AAVAnc80 по сравнению с другими серотипами AAV; у мышей различного возраста (Landegger 2017; Tao 2018;

Yoshimura 2018; Omichi 2020, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки) и у отличных от человека приматов (Andres-Mateos 2019, полностью включена в данный документ посредством ссылки), AAVAnc80 имеет более высокую эффективность трансдукции и более широкий тропизм по сравнению с рядом других капсидов AAV.

[0469] Генная терапия с использованием частиц AAV является многообещающим методом лечения заболеваний внутреннего уха по нескольким причинам, таким как: (1) внутреннее ухо, которое содержит слуховой и вестибулярный сенсорный эпителий, имеет модифицированный иммунный надзор, аналогичный таковому в центральной нервной системе (Fujioka 2014, полностью включено в данный документ посредством ссылки); (2) сенсорные и поддерживающие клетки улиткового Кортиевого органа являются постмитотическими, что допускает возможность длительной экспрессии после однократного введения AAV; и (3) совокупный клинический опыт доставки гAAV как взрослым, так и детям несколькими путями введения предполагает сильный профиль безопасности для AAV в качестве средства доставки, особенно при локализованной доставке и/или в низких и умеренных дозах.

[0470] Начиная с первоначальных клинических испытаний более двух десятилетий назад, частицы гAAV были введены сотням участников в десятках клинических испытаний в дозах до приблизительно 1×10^{15} вг или более для системного введения (см., например, Flotte 1996; Flotte 2013; Parente 2018; Wang 2019, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки). Количество испытаний, в которых частицы AAV использовались для переноса генов *in vivo*, неуклонно растет. Профиль безопасности вместе с высокой эффективностью трансдукции широкого спектра тканей-мишеней сделал частицы гAAV предпочтительной платформой для генной терапии *in vivo* (Wang 2019, полностью включена в данный документ посредством ссылки). Успешное применение технологии гAAV было достигнуто в клинике для лечения различных состояниях, включая нарушения свертывания крови, наследственную слепоту и нейродегенеративные заболевания (см., например, Colella 2018; Wang 2019, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки).

[0471] Препарат в виде частиц гAAV (алипоген типарвовек; Глибера[®]) был впервые одобрен Европейским агентством по лекарственным средствам (EMA) для лечения дефицита липопротеинлипазы в 2012 году. Впоследствии были созданы два продукта на основе гAAV: вретиген непарвовек (voretigene neparvovect-rzyl) (Лукстурна[®]) для лечения дистрофии сетчатки, ассоциированной с подтвержденной биаллельной мутацией *RPE65*, и

онасемноген абепарвовек (onasemnogene aberparvovec-xioi) (Золгенсма®) для лечения спинальной мышечной атрофии (СМА) с биаллельными мутациями в гене *SMN1* были одобрены Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) в 2017 и 2019 годах, соответственно; воретиген непарвовек (Лукстурна®) был также одобрен ЕМА для лечения потери зрения вследствие наследственной дистрофии сетчатки, когда заболевание вызвано мутациями в гене *RPE65*.

[0472] В некоторых вариантах осуществления лекарственные средства и биологические препараты, включая частицы гAAV, могут достигать многих клеток-мишеней во внутреннем ухе, путем их доставки в перилимфу. Перилимфа представляет собой жидкость, очень похожую по составу (Lysaght 2011, полностью включена в данный документ посредством ссылки) и по диффузионной непрерывности на спинномозговую жидкость (СМЖ). Перилимфа омывает большую часть сенсорных, нервных и поддерживающих клеток улитки и вестибулярной системы, расположенных в костном лабиринте внутреннего уха (**фиг. 1 и 3**). В некоторых вариантах осуществления перилимфатическое пространство улитки, в которое доставляется композиция, раскрытая в данном документе, например, гAAV-анти-VEGF, содержит две лестницы или прохода: барабанную лестницу и лестницу преддверия, которые переходят друг в друга на вершине спирали улитки через геликотрему. Многие клетки внутреннего уха находятся в жидкостной непрерывности с перилимфой через интерстициальные пространства в ткани.

[0473] В некоторых вариантах осуществления в данном документе также раскрыто стерильное одноразовое устройство доставки для внутрикохлеарного введения с целью доставки композиции, описанной в данном документе, например, гAAV-анти-VEGF, в перилимфатическую жидкость внутреннего уха через мембрану круглого окна с вентиляционным отверстием, расположенным в основании стремени. В некоторых вариантах осуществления при таком подходе к внутрикохлеарному введению композицию, описанную в данном документе, например, гAAV-анти-VEGF, вводят в барабанную лестницу через мембрану круглого окна с отверстием в основании стремени внутри овального окна, так что композиция перфузируется через барабанную лестницу, затем через лестницу преддверия через соединение в геликотреме и следует по пути жидкости к отверстию в основании стремени (**фиг. 4**). В некоторых вариантах осуществления наличие отверстия, отличного от инъекционного порта, обеспечивает более равномерное распределение лекарственного средства по всей длине улитки и предотвращает пагубное повышение давления дополнительной жидкости во внутреннем ухе. В некоторых вариантах осуществления, о чем свидетельствует транскдукция вестибулярных клеток с

использованием этой методики с двойным окном, для инъекции и вентиляции, этот подход к доставке также обеспечивает диффузию композиции, раскрытой в данном документе, например инъекционного раствора, в вестибулярную систему. В некоторых вариантах осуществления весь процесс может быть выполнен у субъекта относительно нетравматичным доступом через наружный слуховой проход; см. **фиг. 1** и Примеры для получения дополнительной информации о процедуре хирургического введения.

[0474] Опубликован ряд исследований по изучению трансдукции AAVAnc80 у мышей. Различные типы вирусных векторов (например, аденовирусный вектор, вирусный вектор простого герпеса) были рассмотрены для доставки генов во внутреннее ухо на животных моделях (Chen 2001; Wenzel 2007; Husseman 2009, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки); тем не менее, частицы rAAV кажутся перспективным инструментом для доставки генов непосредственно в улитку, учитывая приемлемый профиль безопасности и длительную экспрессию трансгенов, включая восстановление слуховой, кохлеарной и вестибулярной функции в мышинных моделях с нокаутом и нокином (Akil 2012; Kim 2016; Pan 2017; Akil 2019; Al-Moyed 2019; György 2019, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки). Несколько серотипов AAV были доставлены во внутреннее ухо с использованием различных хирургических доступов и доз как у новорожденных, так и у взрослых мышей (см., например, Akil 2012; Askew 2015; Chien 2016; Landegger 2017; Suzuki 2017; Tao 2018; Yoshimura 2018; Akil 2019; Al-Moyed 2019; György 2019; Kim 2019; Omichi 2020, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки). Эффективность трансдукции, оцениваемая по экспрессии GFP в различных типах клеток улиткового и вестибулярного органов, различается в зависимости от постнатального возраста мыши, способа доставки частицы и оцениваемого серотипа или варианта капсида.

[0475] В некоторых вариантах осуществления вариант AAVAnc80 продемонстрировал высокую эффективность нацеливания на кохлеарные и вестибулярные сенсорные клетки (волосковые клетки) и вспомогательные клетки кохлеарных и вестибулярных органов у новорожденных и взрослых мышей по сравнению с другими капсидами AAV (Landegger 2017; Suzuki 2017; Omichi 2020, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки). Неонатальный тропизм Anc80 и эффективность переноса гена оценивали *in vivo* у мышей линии C57BL/6, которым проводили инъекцию в постнатальный день 1 (P1) путем введения через круглое окно (см., например, Landegger 2017, полностью включенный в данный документ посредством ссылки). В соответствии с предыдущими исследованиями, AAV2, AAV6 и AAV8 были нацелены на низкий процент ИНС, а AAV1

был способен трансдуцировать ИНС с более высокой эффективностью, но трансдукция ОНС была минимальной; напротив, AAVAnc80 (1,7E9 вг/улитку) был способен трансдуцировать около 100% ИНС и ~90% ОНС (**фиг. 11**) без какого-либо вредного воздействия на улитку или слуховую функцию (Landegger 2017, полностью включена в данный документ посредством ссылки). В некоторых вариантах осуществления в вестибулярной системе AAVAnc80 трансдуцировал волосковые клетки маточки I и II типа, а также клетки кристы полукружного канала (**фиг. 12**), не влияя на вестибулярную функцию (Landegger 2017, полностью включена в данный документ посредством ссылки).

[0476] Используя другой путь введения через задний полукружный канал, тропизм AAVAnc80 и эффективность переноса генов оценивали у взрослых (7 недель) мышей линии CBA/CaJ (Suzuki 2017, полностью включена в данный документ посредством ссылки). AAVAnc80 (9,6E8 вг/улитку) нацеливался на сенсорные и дополнительные клетки улитки, включая примерно 100% ИНС по всей длине улитки, а также значительную часть ОНС, клетки спирального лимба и мембраны Рейсснера, а также клетки стержня улитки (например, нейроны спирального ганглия и сателлитные глиальные клетки) (**фиг. 13**) при сохранении нормальной функции улитки и слуха (Suzuki 2017, полностью включена в данный документ посредством ссылки). Также были трансдуцированы несколько типов клеток вестибулярной системы, включая подмножество волосковых клеток и практически 100% поддерживающих клеток в кристах маточки и полукружного канала, а также в мешочке (**фиг. 14**), все без вредного воздействия на вестибулярную функцию (Suzuki 2017, полностью включена в данный документ посредством ссылки).

[0477] Совсем недавно трансдукцию AAVAnc80 *in vivo* у взрослых (4 недели) мышей линии C3H/FeJ оценивали с использованием пути доставки, используемого в данном документе (через мембрану круглого окна с фенестрацией заднего полукружного канала), и непосредственно сравнивали с трансдукцией встречающимися в природе серотипами AAV1, AAV2, AAV8 и AAV9 (Omichi 2020, полностью включена в данный документ посредством ссылки). Все частицы вызывали некоторую степень трансдукции без вредного воздействия на слуховую функцию, о чем свидетельствуют контрольные (неинъецированные) пороги ABR. AAVAnc80 (5,5E9 вг/улитка) трансдуцировал практически 100% ИНС по длине улитки и приблизительно от 27 до 66% ОНС в зависимости от расположения в улитке (**фиг. 15**). Несмотря на немного более высокую эффективность трансдукции ОНС с помощью AAV2 (3,68E9 гв/улитку) по сравнению с AAVAnc80, AAVAnc80 сохранял значительно более широкий тропизм, чем AAV2, о чем свидетельствуют eGFP-положительные волосковые клетки мешочка и нейроны

спирального ганглия в улитке; в этих же типах клеток AAV2 практически не продуцировал трансдукцию (**фиг. 15**) (Omichi 2020, полностью включена в данный документ посредством ссылки).

[0478] В некоторых вариантах осуществления способность AAVAnc80 нацеливаться на широкий спектр типов клеток внутреннего уха, включая ИНС и ОНС улитки, поддерживающие клетки, клетки спирального ганглия улитки, волосковые клетки вестибулярного матрикса, мешочка и ампулярного гребешка, а также клетки улитки и вестибулярные поддерживающие/вспомогательные клетки у новорожденных и взрослых мышей предполагают, например, что AAVAnc80 может способствовать развитию подходов генной терапии для заболеваний внутреннего уха.

[0479] В некоторых вариантах осуществления платформенные и вспомогательные исследования проводят на отличных от человека приматах (NHP), с использованием репортерных конструкций для оценки трансдукции AAVAnc80 во внутреннем ухе. В некоторых вариантах осуществления поисковые платформенные и другие вспомогательные исследования проводятся на NHP для оценки тропизма AAVAnc80 и дозозависимых эффектов доставки частиц AAVAnc80. В некоторых вариантах осуществления оценка капсидного тропизма AAVAnc80 для типов клеток внутреннего уха NHP облегчается с использованием частиц гAAVAnc80, содержащих конструкции, кодирующие репортерный трансген усиленного GFP (eGFP) и доставляемых посредством внутрикочlearной инъекции через мембрану круглого окна. В некоторых вариантах осуществления такие частицы также могут быть применимы для разработки новых устройств для эффективной доставки непосредственно в улитку, как описано в данном документе.

[0480] В некоторых вариантах осуществления уши NHP оценивали гистологически на предмет эффективности трансдукции волосковых клеток улитки и зависимости трансдукции волосковых клеток от дозы. В некоторых вариантах осуществления такие уши также анализировали на предмет широты трансдукции клеточного типа в кохлеарных и/или вестибулярных органах. В некоторых вариантах осуществления вполне вероятно, что увеличение популяций клеток внутреннего уха, трансдуцированных частицами гAAV, как описано в данном документе (например, содержащими гAAVAnc80-анти-VEGF), подтверждает вероятность того, что в случае гAAVAnc80-анти-VEGF во внутреннем ухе может поддерживаться устойчивое депо секретируемого анти-VEGF белка; в свою очередь, этот белок может контролировать рост ВШ за счет близости и диффузионной непрерывности с участком опухоли в соседнем внутреннем слуховом проходе. В некоторых вариантах осуществления у NHP также оценивали переносимость процедуры на предмет

выживаемости волосковых клеток, трансдукции в присутствии ранее имевшихся нейтрализующих антител (NAb) и любую возможную трансдукцию контралатерального (неинъецированного) уха. Результаты обобщены в Примерах.

[0481] В некоторых вариантах осуществления рационально разработанный синтетический капсидный вариант AAVAnc80L65 (AAVAnc80) высокоэффективен для трансдукции ИНС приматов в зависимости от дозы при использовании устройства доставки, предназначенного для введения через мембрану круглого окна. В некоторых вариантах осуществления достигается приблизительно от 75 до 100% трансдукции ИНС в инъецированном ухе при использовании частицы AAVAnc80, включающей конструкцию, кодирующую трансген, при дозе приблизительно $6,0 \times 10^{10}$ вг/улитку или выше.

[0482] В некоторых вариантах осуществления, ранее имеющиеся нейтрализующие антитела к AAVAnc80, по меньшей мере на умеренных уровнях в сыворотке, не ингибируют ИНС или трансдукцию поддерживающих клеток, когда частицы доставляют посредством внутрикохлеарного пути введения.

[0483] В некоторых вариантах осуществления качественная оценка инъецированных ушей демонстрирует трансдукцию в нескольких типах кохлеарных и вестибулярных клеток, все из которых способны секретировать анти-VEGF белок либо в перилимфу, либо непосредственно в интерстициальную жидкость улиткового нерва после трансдукции гAAVAnc80-анти-VEGF и тем самым потенциально контролировать рост ВШ посредством диффузии в интерстиции преддверно-улиткового нерва.

[0484] Иллюстративная последовательность ДНК капсида Anc80 AAV (SEQ ID NO: 88)

```
ATGGCTGCCGATGGTTATCTTCCAGATTGGCTCGAGGACAACCTCTCTGAGGGCATT
CGCGAGTGGTGGGACTTGAAACCTGGAGCCCCGAAACCCAAAGCCAACCAGCAAAA
GCAGGACGACGGCCGGGTCTGGTGCTTCCTGGCTACAAGTACCTCGGACCCTTCAA
CGGACTCGACAAGGGGGAGCCCGTCAACGCGGGCGGACGCAGCGGCCCTCGAGCAC
GACAAGGCCTACGACCAGCAGCTCAAAGCGGGTGACAATCCGTACCTGCGGTATAA
CCACGCCGACGCCGAGTTTCAGGAGCGTCTGCAAGAAGATACGTCTTTTGGGGGCA
ACCTCGGGCGAGCAGTCTTCCAGGCCAAGAAGCGGGTTCTCGAACCTCTCGGTCTGG
TTGAGGAAGGCGCTAAGACGGCTCCTGGAAAGAAGAGACCGGTAGAGCAATCACCC
CAGGAACCAGACTCCTCTTCGGGCATCGGCAAGAAAGGCCAGCAGCCCGCGAAGAA
GAGACTCAACTTTGGGCAGACAGGGCGACTCAGAGTCAGTGCCCGACCCTCAACCAC
TCGGAGAACCCCCCGCAGCCCCCTCTGGTGTGGGATCTAATACAATGGCAGCAGGC
```


GGTGGCGCTCCAATGGCAGACAATAACGAAGGCGCCGACGGAGTGGGTAACGCCTC
AGGAAATTGGCATTGCGATTCCACATGGCTGGGCGACAGAGTCATCACCACCAGCA
CCCGAACCTGGGCCCTCCCCACCTACAACAACCACCTCTACAAGCAAATCTCCAGCC
AATCGGGAGCAAGCACCAACGACAACACCTACTTCGGCTACAGCACCCCCTGGGGG
TATTTTGACTTTAACAGATTCCACTGCCACTTCTCACCACGTGACTGGCAGCGACTC
ATCAACAACAACCTGGGGATTCCGGCCCAAGAGACTCAACTTCAAGCTCTTCAACATC
CAGGTCAAGGAGGTCACGACGAATGATGGCACCACGACCATCGCCAATAACCTTAC
CAGCACGGTTCAGGTCTTTACGGACTCGGAATACCAGCTCCCGTACGTCTCCTCGGCTC
TGCGCACCAAGGGCTGCCTGCCTCCGTTCCCGGCGGACGTCTTCATGATTCTCAGTA
CGGGTACCTGACTCTGAACAATGGCAGTCAGGCCGTGGGCCGTTCTCCTTCTACTG
CCTGGAGTACTTTCTTCTCAAATGCTGAGAACGGGCAACAACCTTTGAGTTCAGCTA
CACGTTTGAGGACGTGCCTTTTTCACAGCAGCTACGCGCACAGCCAAAGCCTGGACC
GGCTGATGAACCCCTCATCGACCAGTACCTGTACTACCTGTCTCGGACTCAGACCA
CGAGTGGTACCGCAGGAAATCGGACGTTGCAATTTTCTCAGGCCGGGCCTAGTAGC
ATGGCGAATCAGGCCAAAACTGGCTACCCGGGCCCTGCTACCGGCAGCAACGCGT
CTCCAAGACAGCGAATCAAATAACAACAGCAACTTTGCCTGGACCGGTGCCACCA
AGTATCATCTGAATGGCAGAGACTCTCTGGTAAATCCCGGTCCCGCTATGGCAACCC
ACAAGGACGACGAAGACAAATTTTTTCCGATGAGCGGAGTCTTAATATTTGGGAAA
CAGGGAGCTGGAAATAGCAACGTGGACCTTGACAACGTTATGATAACCAGTGAGGA
AGAAATTAACACCAACCCAGTGGCCACAGAACAGTACGGCACGGTGGCCACTA
ACCTGCAATCGTCAAACACCGCTCCTGCTACAGGGACCGTCAACAGTCAAGGAGCC
TTACCTGGCATGGTCTGGCAGAACCGGGACGTGTACCTGCAGGGTCTATCTGGGCC
AAGATTCCTCACACGGACGGACACTTTCATCCCTCGCCGCTGATGGGAGGCTTTGGA
CTGAAACACCCGCCTCCTCAGATCCTGATTAAGAATACACCTGTTCCCGCGAATCCT
CCAACCTACCTTCAGTCCAGCTAAGTTTTCGTCGTTTCATCACGCAGTACAGCACCGGA
CAGGTCAGCGTGGAAATTGAATGGGAGCTGCAGAAAGAAAACAGCAAACGCTGGA
ACCCAGAGATTCAATACACTTCCAACCTACAACAATCTACAAATGTGGACTTTGCTG
TTGACACAATGGCGTTTATTCTGAGCCTCGCCCCATCGGCACCCGTTACCTCACCC
GTAATCTG

**[0485] Иллюстративная аминокислотная последовательность капсида Anc80 AAV
(SEQ ID NO: 89)**

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPF
NGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTSFGG
NLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSSGIGKKGQPAKKRL

NFGQTGDSESVDPDPQLGEPPEAPSGVGSNTMAAGGGAPMADNNEGADGVGNASGNW
HCDSTWLGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASTNDNTYFGYSTPWGYFDFNR
FHCHFSRPDWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTTNDGTTTIANNLTSTVQVFTD
SEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLR
TGNNFEFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTQTTSGTAGNRTLQFSQ
AGPSSMANQAKNWLPGPCYRQQRVSKTANQNNNSNFAWTGATKYHLNGRDSLVPNG
PAMATHKDDDEDKFFPMSGVLIFGKQGAGNSNVLDLNDVMITSEEEIKTTNPVATEQYGT
VATNLQSSNTAPATGTVNSQGALPGMVWQNRDVYLQGPWAKIPHTDGHFHPSPLMG
GFGLKHPPPQILIKNTPVPANPPTTFSPAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNP
EIQYTSNYNKSTNVDFAVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL

**[0486] Иллюстративная аминокислотная последовательность капсида Anc80 AAV
(SEQ ID NO: 113)**

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYL
GPFNGLDKGEVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADADEFQERLQED
TSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSSGIGKKG
QQPAX₁KRLNFGQTGDSESVDPDPQLGEPPEAPSGVGSNTMX₂AGGGAPMADNNEG
ADGVGNASGNWHCDSTWLGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGX₃STNDN
TYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSRPDWQRLINNNWGFRPKX₄LNFKLFNIQVKEVTT
NDGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLN
GSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNFX₅FSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLI
DQYLYLSRTQTTSGTAGNRX₆LQFSQAGPSSMANQAKNWLPGPCYRQQRVSKTX₇
NQNNSNFAWTGATKYHLNGRDSLVPNGPAMATHKDDDEDKFFPMSGVLIFGKQG
AGNSNVLDLNDVMITX₈EEEIKTTNPVATEX₉YGTVATNLQSX₁₀NTAPATGTVNSQG
ALPGMVWQX₁₁RDVYLQGPWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVP
ANPPTTFSPAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYNKSTNVD
FAVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL

Символ в SEQ ID NO: 113	Соответствующая аминокислота
X ₁	К или R
X ₂	А или S
X ₃	А или G
X ₄	R или k

X ₅	Е или Q
X ₆	Т или Е
X ₇	А или Т
X ₈	S или N
X ₉	Q или Е
X ₁₀	S или А
X ₁₁	N или D

[0487] Иллюстративная аминокислотная последовательность капсида Anc80 AAV (SEQ ID NO: 114)

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPF
 NGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADAQERLQEDTSFGG
 NLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSSGIGKKGGQPARKRL
 NFGQTGDSESVDPDPQPLGEPAAAPSGVGSNTMAAGGGAPMADNNEGADGVGNASGNW
 HCDSTWLGDRVITSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGGSTNDNTYFGYSTPWGYFDFNR
 FHCHFSPRDWQRLINNNWGFPRPKLNFKLFNIQVKEVTTNDGTTTIANNLTSTVQVFTD
 SEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLR
 TGNNFQFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTQTTSGTAGNRTLQFSQ
 AGPSSMANQAKNWLPGPCYRQQRVSKTTNQNNSNFAWTGATKYHLNGRDSL VNP GP
 AMATHKDDKFFPMSGVLIFGKQGAGNSNVLDNVMITNEEEIKTTNPVATEEYGTV
 ATNLQSANTAPATGTVNSQALPGMVWQDRDVYLQGPWAKIPHTDGHFHPSPLMGG
 FGLKHPPPQILIKNTPVPANPPTTFSPAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEI
 QYTSNYNKSTNVDFAVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL

Иллюстративные частицы AAV

[0488] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к композиции гAAV-анти-VEGF, содержащей частицу, содержащую гAAV2/Anc80L65-CAG.ранибизумаб.bGH. В некоторых вариантах осуществления композиция гAAV-анти-VEGF содержит: а) Anc80L65, рационально разработанный синтетический капсид AAV; б) инвертированные концевые повторы, происходящие от AAV2 (выше и ниже по ходу транскрипции); с) ранний энхансерный элемент цитомегаловируса (CMV), последовательность гена бета-актина курицы (*CβA*), расположенную между 5'-фланкирующей областью и проксимальной областью второго экзона, и 3'-

последовательность сплайсинга, полученную из гена бета-глобина кролика (*RβG*) (Miyazaki 1989; Niwa 1991; и Orbán 2009, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки), которые вместе обычно называют промотором CAG (выше по ходу транскрипции); d) последовательность, кодирующую ранибизумаб (фрагмент антитела [Fab]), включающую: i) бицистронную кассету, кодирующую переменные области тяжелой и легкой цепи ранибизумаба, разделенные сайтами расщепления фурином и протеазой вируса *Thosea asigna* 2A (T2A), и ii) лидерную последовательность интерлейкина-2 (IL-2) длиной 20 аминокислот, клонированную выше каждой Fab-цепи для облегчения секреции белка; и e) сигнал полиаденилирования (pA) бычьего гормона роста (bGH) (ниже по ходу транскрипции).

[0489] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к композиции гAAVAnc80-анти-VEGF, содержащей частицу, содержащую гAAV2/Anc80L65-CAG.бевацизумаб.bGH. В определенных вариантах осуществления композиция гAAV-анти-VEGF содержит: a) Anc80L65, рационально разработанный синтетический капсид AAV; b) инвертированные концевые повторы, происходящие от AAV2 (выше и ниже по ходу транскрипции); c) ранний энхансерный элемент цитомегаловируса (CMV), последовательность гена бета-актина курицы (*CβA*), расположенную между 5'-фланкирующей областью и проксимальной областью второго экзона, и 3'-последовательность сплайсинга, полученную из гена бета-глобина кролика (*RβG*) (Miyazaki 1989; Niwa 1991; Orbán 2009, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки), которые вместе обычно называют промотором CAG (выше по ходу транскрипции); d) последовательность, кодирующую бевацизумаб (антитело, содержащее области Fab и Fc), включающую: i) бицистронную кассету, кодирующую переменные области тяжелой и легкой цепи ранибизумаба, разделенные сайтами расщепления фурином и протеазой вируса *Thosea asigna* 2A (T2A), и ii) лидерную последовательность интерлейкина-2 (IL-2) длиной 20 аминокислот, клонированную выше каждой Fab-цепи для облегчения секреции белка; и e) сигнал полиаденилирования (pA) бычьего гормона роста (bGH) (ниже по ходу транскрипции).

[0490] В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к композиции гAAVAnc80-анти-VEGF, содержащей частицу, содержащую гAAV2/Anc80L65-CAG.афлиберцепт.bGH. В определенных вариантах осуществления композиция гAAV-анти-VEGF содержит: a) Anc80L65, рационально разработанный синтетический капсид AAV; b) инвертированные концевые повторы, происходящие от AAV2 (выше и ниже по течению); c) ранний энхансерный элемент цитомегаловируса

(CMV), последовательность гена бета-актина курицы (*CβA*), расположенную между 5'-фланкирующей областью и проксимальной областью второго экзона, и 3'-последовательность сплайсинга, полученную из гена бета-глобина кролика (*RβG*) (Miyazaki 1989; Niwa 1991; Orbán 2009, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки), которые вместе обычно называют промотором CAG (выше по ходу транскрипции); d) последовательность, кодирующую афлиберцепт, содержащую i) необязательную лидерную последовательность интерлейкина-2 (IL-2) человека длиной 20 аминокислот и ii) рекомбинантный слитый белок, состоящий из частей внеклеточных доменов рецепторов VEGF 1 и 2 человека, слитых с Fc часть IgG1 человека; и e) сигнал полиаденилирования (pA) бычьего гормона роста (bGH) (ниже по ходу транскрипции).

Композиции

[0491] Помимо прочего, в настоящем изобретении предложены композиции. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит описанную в данном документе конструкцию. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит одну или более конструкций, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит множество описанных в данном документе конструкций. В некоторых вариантах осуществления, когда в композицию включено более одной конструкции, конструкции отличаются друг от друга.

[0492] В некоторых вариантах осуществления композиция содержит частицу гAAV, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит одну или более частиц гAAV, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит множество частиц гAAV. В некоторых вариантах осуществления, когда в композицию включено более одной частицы гAAV, все частицы гAAV отличаются друг от друга.

[0493] В некоторых вариантах осуществления композиция содержит анти-VEGF белок. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит клетку. В некоторых вариантах осуществления композиция представляет собой или включает фармацевтическую композицию.

[0494] В некоторых вариантах осуществления частица гAAVAnc80-анти-VEGF состоит из капсида AAVAnc80 и генома одноцепочечной ДНК, кодирующего ранибизумаб, фрагмент гуманизированного моноклонального антитела (Fab) с молекулярной массой 48 килодальтон (кДа), который используется в клинических условиях для ингибирования VEGF. В некоторых вариантах осуществления гAAVAnc80-анти-VEGF будет

производиться в CRO или на собственном предприятии, работающем согласно GMP.

[0495] В некоторых вариантах осуществления гAAVAnc80-анти-VEGF продуцируется посредством временной трансфекции эпителиальных клеток эмбриональной почки человека (HEK) 293. В некоторых вариантах осуществления осветленный сбор клеток очищают с помощью аффинной хроматографии с последующей дополнительной очисткой и обогащением полных частиц гAAVAnc80 с помощью разделения в изопикническом градиенте с хлоридом цезия. В некоторых вариантах осуществления буфер состава состоит из стерильной воды, содержащей монофосфат калия в диапазоне 0,1-5 мМ (например, 1,5 мМ монофосфата калия), двухосновного фосфата натрия в диапазоне 1-20 мМ (например, 8,1 мМ двухосновного фосфата натрия), хлорида калия в диапазоне 0,1–10 мМ (например, 2,7 мМ хлорида калия), хлорида натрия в диапазоне 100–1000 мМ (например, 172 мМ хлорида натрия) и полоксамера в диапазоне 0,0001-0,001% (например, 0,001% полоксамера 188). В некоторых вариантах осуществления частица гAAVAnc80, содержащая конструкцию, после очистки и составления называется лекарственным веществом. В некоторых вариантах осуществления лекарственное вещество затем стерильно фильтруют (например, с использованием фильтра с размером пор 0,2 микрона [мкм]) и асептически разливают для однократного применения в стерильные флаконы и закупоривают. В некоторых вариантах осуществления эти аликвоты во флаконах представляют собой лекарственный препарат и хранятся при соответствующей температуре до дня введения (например, от 4°C до -100°C, например, при $\leq -65^\circ\text{C}$).

[0496] В некоторых вариантах осуществления может быть создан отдельный лекарственный продукт-разбавитель (например, разбавитель AAVAnc80), состав которого может быть эквивалентен или почти эквивалентен составу буферного раствора. В некоторых вариантах осуществления такой разбавитель можно подвергать стерильной фильтрации (фильтр 0,2 мкм), асептически разлить для одноразового использования в стерильные флаконы и хранить при соответствующей температуре до дня введения (например, при температуре от 4°C до -100°C, например, при $\leq -65^\circ\text{C}$). В некоторых вариантах осуществления лекарственный продукт-разбавитель используется для приготовления концентрации, необходимой для доз лекарственного вещества, описанных в данном документе.

Дозировка и объем введения

[0497] В некоторых вариантах осуществления раскрытую в данном документе композицию, например, один или более векторов AAV, раскрытых в данном документе,

осуществления раскрытую в данном документе композицию вводят в объеме около 1,80 мл. В некоторых вариантах осуществления раскрытую в данном документе композицию вводят в объеме около 1,90 мл. В некоторых вариантах осуществления раскрытую в данном документе композицию вводят в объеме около 2,00 мл.

[0500] В некоторых вариантах осуществления раскрытую в данном документе композицию (например, композицию, содержащую одну или более конструкций гAAV, раскрытых в данном документе) вводят в объеме от около 0,01 до 2,00 мл, от около 0,02 до 1,90 мл, от около 0,03 до 1,8 мл, от около 0,04 мл до 1,70 мл, от около 0,05 до 1,60 мл, от около 0,06 до 1,50 мл, от около 0,06 до 1,40 мл, от около 0,07 до 1,30 мл, от около 0,08 до 1,20 мл или от около 0,09 до 1,10 мл. В некоторых вариантах осуществления раскрытую в данном документе композицию (например, композицию, содержащую одну или множество конструкций гAAV, раскрытых в данном документе) вводят в объеме от около 0,01 до 2,00 мл, от около 0,02 до 2,00 мл, от около 0,03 до 2,00 мл, от около 0,04 до 2,00 мл, от около 0,05 до 2,00 мл, от около 0,06 до 2,00 мл, от около 0,07 до 2,00 мл, от около 0,08 до 2,00 мл, от около 0,09 до 2,00 мл, от около 0,01 до 1,90 мл, от около 0,01 до 1,80 мл, от около 0,01 до 1,70 мл, от около 0,01 до 1,60 мл, от около 0,01 до 1,50 мл, от около 0,01 до 1,40 мл, от около 0,01 до 1,30 мл, от около 0,01 до 1,20 мл, от около 0,01 до 1,10 мл, от около 0,01 до 1,00 мл, от около 0,01 до 0,09 мл.

[0501] В некоторых вариантах осуществления композицию, раскрытую в данном документе (например, композицию, включающую одну или множество конструкций гAAV, раскрытых в данном документе) вводят в объеме от около 0,01 мл до около 0,30 мл, от около 0,01 мл до около 0,25 мл, от около 0,01 мл до около 0,20 мл, от около 0,01 мл до около 0,15 мл, от около 0,01 мл до около 0,14 мл, от около 0,01 мл до около 0,13 мл, от около 0,01 мл до около 0,12 мл, от около 0,01 мл до около 0,11 мл, от около 0,01 мл до около 0,10 мл, от около 0,01 мл до около 0,09 мл, от около 0,01 мл до около 0,08 мл, от около 0,01 мл до около 0,07 мл, от около 0,01 мл до около 0,06 мл, от около 0,01 мл до около 0,05 мл, от около 0,01 мл до около 0,04 мл, от около 0,01 мл до около 0,03 мл или от около 0,01 мл до около 0,02 мл.

[0502] В некоторых вариантах осуществления композицию, раскрытую в данном документе (например, композицию, включающую одну или множество конструкций гAAV, раскрытых в данном документе) вводят в объеме от около в объеме от около 0,02 мл до около 0,30 мл, от 0,03 мл до около 0,30 мл, от 0,04 мл до около 0,30 мл, от 0,05 мл до около 0,30 мл, от 0,06 мл до около 0,30 мл, от 0,07 мл до около 0,30 мл, от 0,08 мл до около 0,30 мл, от 0,09 мл до около 0,30 мл, от 0,10 мл до около 0,30 мл, от 0,11 мл до около 0,30 мл, от

документе (например, композицию, содержащую одну или множество раскрытых в данном документе конструкций гAAV) вводят в количестве не более 1×10^{15} , не более 5×10^{14} , не более 1×10^{14} , не более 5×10^{13} , не более 1×10^{13} , не более 9×10^{12} , не более 8×10^{12} , не более 7×10^{12} , не более 6×10^{12} , не более 5×10^{12} , не более 4×10^{12} , не более 3×10^{12} , не более 2×10^{12} или не более 1×10^{12} векторных геномов (вг) на миллилитр (мл) (вг/мл).

[0508] В некоторых вариантах осуществления композицию, раскрытую в данном документе (например, композицию, содержащую одну или множество конструкций гAAV, раскрытых в данном документе), вводят в количестве около 1×10^{12} вг/мл, около $1,1 \times 10^{12}$ вг/мл, $1,2 \times 10^{12}$ вг/мл, около $1,3 \times 10^{12}$ вг/мл, около $1,4 \times 10^{12}$ вг/мл, около $1,5 \times 10^{12}$ вг/мл, около $1,6 \times 10^{12}$ вг/мл, около $1,7 \times 10^{12}$ вг/мл, около $1,8 \times 10^{12}$ вг/мл, около $1,9 \times 10^{12}$ вг/мл, около $2,0 \times 10^{12}$ вг/мл, около $2,1 \times 10^{12}$ вг/мл, около $2,2 \times 10^{12}$ вг/мл, около $2,3 \times 10^{12}$ вг/мл, около $2,4 \times 10^{12}$ вг/мл, около $2,5 \times 10^{12}$ вг/мл, около $2,6 \times 10^{12}$ вг/мл, около $2,7 \times 10^{12}$ вг/мл, около $2,8 \times 10^{12}$ вг/мл, около $2,9 \times 10^{12}$ вг/мл, около $3,0 \times 10^{12}$ вг/мл, около $3,1 \times 10^{12}$ вг/мл, около $3,2 \times 10^{12}$ вг/мл, около $3,3 \times 10^{12}$ вг/мл, около $3,4 \times 10^{12}$ вг/мл, около $3,5 \times 10^{12}$ вг/мл, около $3,6 \times 10^{12}$ вг/мл, около $3,7 \times 10^{12}$ вг/мл, около $3,8 \times 10^{12}$ вг/мл, около $3,9 \times 10^{12}$ вг/мл, около $4,0 \times 10^{12}$ вг/мл, около $4,1 \times 10^{12}$ вг/мл, около $4,2 \times 10^{12}$ вг/мл, около $4,3 \times 10^{12}$ вг/мл, около $4,4 \times 10^{12}$ вг/мл, около $4,5 \times 10^{12}$ вг/мл, около $4,6 \times 10^{12}$ вг/мл, около $4,7 \times 10^{12}$ вг/мл, около $4,8 \times 10^{12}$ вг/мл, около $4,9 \times 10^{12}$ вг/мл, около $5,0 \times 10^{12}$ вг/мл, около $5,1 \times 10^{12}$ вг/мл, около $5,2 \times 10^{12}$ вг/мл, около $5,3 \times 10^{12}$ вг/мл, около $5,4 \times 10^{12}$ вг/мл, около $5,5 \times 10^{12}$ вг/мл, около $5,6 \times 10^{12}$ вг/мл, около $5,7 \times 10^{12}$ вг/мл, около $5,8 \times 10^{12}$ вг/мл, около $5,9 \times 10^{12}$ вг/мл, около $6,0 \times 10^{12}$ вг/мл, около $7,0 \times 10^{12}$ вг/мл, около $8,0 \times 10^{12}$ вг/мл, около $9,0 \times 10^{12}$ вг/мл, около $9,1 \times 10^{12}$ вг/мл, около $9,2 \times 10^{12}$ вг/мл, около $9,3 \times 10^{12}$ вг/мл, около $9,4 \times 10^{12}$ вг/мл, около $9,5 \times 10^{12}$ вг/мл, около $9,6 \times 10^{12}$ вг/мл, около $9,7 \times 10^{12}$ вг/мл, около $9,8 \times 10^{12}$ вг/мл, около $9,9 \times 10^{12}$ вг/мл, около 1×10^{13} вг/мл, $1,1 \times 10^{13}$ вг/мл, $1,2 \times 10^{13}$ вг/мл, $1,3 \times 10^{13}$ вг/мл, $1,4 \times 10^{13}$ вг/мл, $1,5 \times 10^{13}$ вг/мл, $1,6 \times 10^{13}$ вг/мл, $1,7 \times 10^{13}$ вг/мл, $1,8 \times 10^{13}$ вг/мл, $1,9 \times 10^{13}$ вг/мл, 2×10^{13} вг/мл, 5×10^{13} вг/мл или 1×10^{14} вг/мл.

[0509] В некоторых вариантах осуществления композицию, раскрытую в данном документе (например, композицию, содержащую одну или множество конструкций гAAV, раскрытых в данном документе), вводят в количестве $2,5 \times 10^{12}$ вг/мл +/- 10%. В некоторых вариантах осуществления композицию, раскрытую в данном документе (например, композицию, содержащую одну или множество конструкций гAAV, раскрытых в данном документе), вводят в количестве $2,5 \times 10^{12}$ вг/мл.

[0510] В некоторых вариантах осуществления композицию, раскрытую в данном документе (например, композицию, содержащую одну или множество конструкций гAAV,

вг/улитку, от около 1×10^{10} до около 1×10^{12} вг/улитку, от около 1×10^{10} до около 9×10^{11} вг/улитку, от около 1×10^{10} до около 8×10^{11} вг/улитку, от около 1×10^{10} до около 7×10^{11} вг/улитку, от около 1×10^{10} до около 6×10^{11} вг/улитку, от около 1×10^{10} до около 5×10^{11} вг/улитку, от около 1×10^{10} до около 4×10^{11} вг/улитку, от около 1×10^{10} до около 3×10^{11} вг/улитку, от около 1×10^{10} до около 2×10^{11} вг/улитку, от около 1×10^{10} до около 1×10^{11} вг/улитку, от около 1×10^{10} до около 9×10^{10} вг/улитку, от около 1×10^{10} до около 8×10^{10} вг/улитку, от около 1×10^{10} до около 7×10^{10} вг/улитку, от около 1×10^{10} до около 6×10^{10} вг/улитку, от около 1×10^{10} до около 5×10^{10} вг/улитку, от около 1×10^{10} до около 4×10^{10} вг/улитку, от около 1×10^{10} до около 3×10^{10} вг/улитку, до около 1×10^{10} до около 2×10^{10} вг/улитку.

[0514] В некоторых вариантах осуществления композицию, раскрытую в данном документе (например, композицию, содержащую одну или множество конструкций гААV, раскрытых в данном документе), вводят в количестве от около 1×10^{10} до около 1×10^{13} вг/улитку, от около 5×10^{10} до около 5×10^{12} вг/улитку, от около 8×10^{10} до около 1×10^{12} вг/улитку, от около 1×10^{11} до около 9×10^{11} вг/улитку, от около 2×10^{11} до около 8×10^{11} вг/улитку, от около $2,5 \times 10^{11}$ до около 5×10^{11} вг/улитку, от около 3×10^{11} до около $4,5 \times 10^{11}$ вг/улитку.

[0515] В некоторых вариантах осуществления композицию, раскрытую в данном документе (например, композицию, содержащую одну или множество конструкций гААV, раскрытых в данном документе), вводят в количестве около 1×10^{10} вг/улитку, около 5×10^{10} вг/улитку, около 1×10^{11} вг/улитку, около $1,5 \times 10^{11}$ вг/улитку, около 2×10^{11} вг/улитку, около $2,1 \times 10^{11}$ вг/улитку, $2,2 \times 10^{11}$ вг/улитку, $2,3 \times 10^{11}$ вг/улитку, $2,4 \times 10^{11}$ вг/улитку, около $2,5 \times 10^{11}$ вг/улитку, $2,6 \times 10^{11}$ вг/улитку, $2,7 \times 10^{11}$ вг/улитку, $2,8 \times 10^{11}$ вг/улитку, $2,9 \times 10^{11}$ вг/улитку, около 3×10^{11} вг/улитку, $3,1 \times 10^{11}$ вг/улитку, $3,2 \times 10^{11}$ вг/улитку, $3,3 \times 10^{11}$ вг/улитку, $3,4 \times 10^{11}$ вг/улитку, около $3,5 \times 10^{11}$ вг/улитку, $3,6 \times 10^{11}$ вг/улитку, $3,7 \times 10^{11}$ вг/улитку, $3,8 \times 10^{11}$ вг/улитку, $3,9 \times 10^{11}$ вг/улитку, около 4×10^{11} вг/улитку, $4,1 \times 10^{11}$ вг/улитку, $4,2 \times 10^{11}$ вг/улитку, $4,3 \times 10^{11}$ вг/улитку, $4,4 \times 10^{11}$ вг/улитку, около $4,5 \times 10^{11}$ вг/улитку, $4,6 \times 10^{11}$ вг/улитку, $4,7 \times 10^{11}$ вг/улитку, $4,8 \times 10^{11}$ вг/улитку, $4,9 \times 10^{11}$ вг/улитку, около 5×10^{11} вг/улитку, около $5,5 \times 10^{11}$ вг/улитку, около 6×10^{11} вг/улитку, около $6,5 \times 10^{11}$ вг/улитку, около 7×10^{11} вг/улитку, около $7,5 \times 10^{11}$ вг/улитку, около 8×10^{11} вг/улитку, около $8,5 \times 10^{11}$ вг/улитку, около 9×10^{11} вг/улитку, около $9,5 \times 10^{11}$ вг/улитку, около 1×10^{12} вг/улитку.

[0516] В некоторых вариантах осуществления композицию, раскрытую в данном документе (например, композицию, содержащую одну или множество конструкций гААV,

раскрытых в данном документе), вводят в количестве $2,3 \times 10^{11}$ вг/ улитку, +/- 10%. В некоторых вариантах осуществления композицию, раскрытую в данном документе (например, композицию, содержащую одну или множество конструкций гAAV, раскрытых в данном документе), вводят в количестве $2,3 \times 10^{11}$ вг/улитку.

[0517] В некоторых вариантах осуществления композицию, раскрытую в данном документе (например, композицию, содержащую одну или множество конструкций гAAV, раскрытых в данном документе), вводят в количестве $4,5 \times 10^{11}$ вг/ улитку, +/- 10%. В некоторых вариантах осуществления композицию, раскрытую в данном документе (например, композицию, содержащую одну или множество конструкций гAAV, раскрытых в данном документе), вводят в количестве $4,5 \times 10^{11}$ вг/улитку.

[0518] В некоторых вариантах осуществления композицию, раскрытую в данном документе (например, композицию, содержащую одну или множество конструкций гAAV, раскрытых в данном документе), вводят в количестве 9×10^{11} вг/ улитку, +/- 10%. В некоторых вариантах осуществления композицию, раскрытую в данном документе (например, композицию, содержащую одну или множество конструкций гAAV, раскрытых в данном документе), вводят в количестве 9×10^{11} вг/улитку.

Композиции одиночной конструкции AAV

[0519] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены композиции или системы, содержащие частицы гAAV, состоящие из одной конструкции. В некоторых таких вариантах осуществления одна конструкция может доставлять полинуклеотид, который кодирует функциональную (например, как было описано ранее и/или иным образом функциональную, например, оптимизированную по кодонам) копию анти-VEGF гена. В некоторых вариантах осуществления конструкция представляет собой конструкцию гAAV или содержит ее. В некоторых вариантах осуществления, описанных в данном документе, одиночная конструкция гAAV способна экспрессировать полноразмерную матричную РНК (мРНК) анти-VEGF или ее характерный белок в клетке-мишени (например, клетке внутреннего уха). В некоторых вариантах осуществления одиночная конструкция (например, любая из конструкций, описанных в данном документе) может включать последовательность, кодирующую функциональный анти-VEGF белок (например, любую конструкцию, которая генерирует функциональный анти-VEGF белок). В некоторых вариантах осуществления одиночная конструкция (например, любая из конструкций, описанных в данном документе) может включать последовательность, кодирующую функциональный анти-VEGF белок (например, любую конструкцию, которая

генерирует функциональный анти-VEGF белок) и необязательно дополнительные полипептидные последовательности (например, регуляторные последовательности и/или репортерные последовательности).

[0520] В некоторых вариантах осуществления композиция или система одиночной конструкции могут содержать любой или все иллюстративные компоненты конструкции, описанные в данном документе. В некоторых вариантах осуществления иллюстративная одиночная конструкция представлена SEQ ID NO: 90. В некоторых вариантах осуществления иллюстративная одиночная конструкция представлена SEQ ID NO: 91. В некоторых вариантах осуществления иллюстративная одиночная конструкция представлена SEQ ID NO: 92. В некоторых вариантах осуществления иллюстративная одиночная конструкция представлена SEQ ID NO: 93. В некоторых вариантах осуществления иллюстративная одиночная конструкция представлена SEQ ID NO: 94. В некоторых вариантах осуществления иллюстративная одиночная конструкция представлена SEQ ID NO: 95. В некоторых вариантах осуществления иллюстративная одиночная конструкция представлена SEQ ID NO: 96. В некоторых вариантах осуществления иллюстративная одиночная конструкция представлена SEQ ID NO: 106. В некоторых вариантах осуществления иллюстративная одиночная конструкция представлена SEQ ID NO: 107. В некоторых вариантах осуществления иллюстративная одиночная конструкция по меньшей мере на 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентична последовательности, представленной SEQ ID NO: 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 106 или 107. Специалисту в данной области известно, что конструкции могут подвергаться дополнительным модификациям, включая оптимизацию по кодонам, внесение новых, но функционально эквивалентных (например, молчащих мутаций), добавление репортерных последовательностей и/или другие стандартные модификации.

[0521] В некоторых вариантах осуществления конструкция имеет последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 90, эта конструкция может называться конструкцией гAAV-ранибизумаб-РС, является иллюстративным вариантом осуществления схемы, показанной на **фиг. 6, панель (А)**, и кодирует анти-VEGF белок ранибизумаб. В некоторых вариантах осуществления иллюстративная конструкция содержит: 5' ITR, пример которого представлен в SEQ ID NO: 47, необязательно сайт клонирования, пример которого представлен в SEQ ID NO: 81, энхансер CMV, пример которого представлен в SEQ ID NO: 64, промотор СВА, пример которого представлен в SEQ ID NO: 50, химерный интрон, пример которого представлен в SEQ ID NO: 65, необязательно сайт клонирования, пример которого представлен в SEQ ID NO: 78, кодирующую анти-VEGF область, пример которой

представлен в SEQ ID NO: 103, необязательно сайт клонирования, пример которого представлен в SEQ ID NO: 79, сайт поли(A), пример которого представлен в SEQ ID NO: 75, необязательно сайт клонирования, пример которого представлен в SEQ ID NO: 82, и 3' ITR, пример которого представлен в SEQ ID NO: 48.

[0522] В некоторых вариантах осуществления конструкция имеет последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 91, эта конструкция может называться конструкцией гAAV-ранибизумаб, является иллюстративным вариантом осуществления схемы, показанной на **фиг. 6, панель (А)**, и кодирует анти-VEGF белок ранибизумаб. В некоторых вариантах осуществления иллюстративная конструкция содержит: 5' ITR, пример которого представлен в SEQ ID NO: 45, необязательно сайт клонирования, пример которого представлен в SEQ ID NO: 77, энхансер CMV, пример которого представлен в SEQ ID NO: 64, промотор СВА, пример которого представлен в SEQ ID NO: 49, химерный интрон, пример которого представлен в SEQ ID NO: 65, необязательно сайт клонирования, пример которого представлен в SEQ ID NO: 78, кодирующую анти-VEGF область, пример которой представлен в SEQ ID NO: 103, необязательно сайт клонирования, пример которого представлен в SEQ ID NO: 79, сайт поли(A), пример которого представлен в SEQ ID NO: 75, необязательно сайт клонирования, пример которого представлен в SEQ ID NO: 80, и 3' ITR, пример которого представлен в SEQ ID NO: 46.

[0523] В некоторых вариантах осуществления конструкция имеет последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 92, эта конструкция может называться конструкцией гAAV-ранибизумаб.2, является иллюстративным вариантом осуществления схемы, показанной на **фиг. 6, панель (А)**, и кодирует анти-VEGF белок ранибизумаб. В некоторых вариантах осуществления иллюстративная конструкция содержит: 5' ITR, пример которого представлен в SEQ ID NO: 45, необязательно сайт клонирования, пример которого представлен в SEQ ID NO: 77, энхансер CMV, пример которого представлен в SEQ ID NO: 64, промотор СВА, пример которого представлен в SEQ ID NO: 50, химерный интрон, пример которого представлен в SEQ ID NO: 65, необязательно сайт клонирования, пример которого представлен в SEQ ID NO: 78, кодирующую анти-VEGF область, пример которой представлен в SEQ ID NO: 103, необязательно сайт клонирования, пример которого представлен в SEQ ID NO: 79, сайт поли(A), пример которого представлен в SEQ ID NO: 75, необязательно сайт клонирования, пример которого представлен в SEQ ID NO: 80, и 3' ITR, пример которого представлен в SEQ ID NO: 46.

[0524] В некоторых вариантах осуществления конструкция имеет последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 106, эта конструкция может называться конструкцией гAAV-

ранибизумаб-GFP, является иллюстративным вариантом осуществления схемы, показанной на **фиг. 6, панель (B)**, и кодирует анти-VEGF белок ранибизумаб. В некоторых вариантах осуществления иллюстративная конструкция содержит: 5' ITR, пример которого представлен в SEQ ID NO: 47, необязательно сайт клонирования, пример которого представлен в SEQ ID NO: 81, энхансер CMV, пример которого представлен в SEQ ID NO: 64, промотор CBA, пример которого представлен в SEQ ID NO: 50, химерный интрон, пример которого представлен в SEQ ID NO: 65, необязательно сайт клонирования, пример которого представлен в SEQ ID NO: 78, кодирующую анти-VEGF область, пример которой представлен в SEQ ID NO: 103, необязательно репортерную последовательность, пример которой представлен в SEQ ID NO: 104, необязательно сайт клонирования, пример которого представлен в SEQ ID NO: 79, сайт поли(A), пример которого представлен в SEQ ID NO: 75, необязательно сайт клонирования, пример которого представлен в SEQ ID NO: 82, и 3' ITR, пример которого представлен в SEQ ID NO: 48.

[0525] В некоторых вариантах осуществления конструкция имеет последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 93, эта конструкция может называться конструкцией гAAV-бевацизумаб-PC, является иллюстративным вариантом осуществления схемы, показанной на **фиг. 6, панель (C)**, и кодирует анти-VEGF белок бевацизумаб. В некоторых вариантах осуществления иллюстративная конструкция содержит: 5' ITR, пример которого представлен в SEQ ID NO: 47, необязательно сайт клонирования, пример которого представлен в SEQ ID NO: 81, энхансер CMV, пример которого представлен в SEQ ID NO: 64, промотор CBA, пример которого представлен в SEQ ID NO: 50, химерный интрон, пример которого представлен в SEQ ID NO: 65, необязательно сайт клонирования, пример которого представлен в SEQ ID NO: 78, кодирующую анти-VEGF область, пример которой представлен в SEQ ID NO: 22, необязательно сайт клонирования, пример которого представлен в SEQ ID NO: 79, сайт поли(A), пример которого представлен в SEQ ID NO: 75, необязательно сайт клонирования, пример которого представлен в SEQ ID NO: 82, и 3' ITR, пример которого представлен в SEQ ID NO: 48.

[0526] В некоторых вариантах осуществления конструкция имеет последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 94, эта конструкция может называться конструкцией гAAV-бевацизумаб, является иллюстративным вариантом осуществления схемы, показанной на **фиг. 6, панель (C)**, и кодирует анти-VEGF белок бевацизумаб. В некоторых вариантах осуществления иллюстративная конструкция содержит: 5' ITR, пример которого представлен в SEQ ID NO: 45, необязательно сайт клонирования, пример которого представлен в SEQ ID NO: 77, энхансер CMV, пример которого представлен в SEQ ID NO:

64, промотор СВА, пример которого представлен в SEQ ID NO: 49, химерный интрон, пример которого представлен в SEQ ID NO: 65, необязательно сайт клонирования, пример которого представлен в SEQ ID NO: 78, кодирующую анти-VEGF область, пример которой представлен в SEQ ID NO: 22, необязательно сайт клонирования, пример которого представлен в SEQ ID NO: 79, сайт поли(A), пример которого представлен в SEQ ID NO: 75, необязательно сайт клонирования, пример которого представлен в SEQ ID NO: 80, и 3' ITR, пример которого представлен в SEQ ID NO: 46.

[0527] В некоторых вариантах осуществления конструкция имеет последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 107, эта конструкция может называться конструкцией гAAV-бевацизумаб-GFP, является иллюстративным вариантом осуществления схемы, показанной на **фиг. 6, панель (B)**, и кодирует анти-VEGF белок бевацизумаб. В некоторых вариантах осуществления иллюстративная конструкция содержит: 5' ITR, пример которого представлен в SEQ ID NO: 47, необязательно сайт клонирования, пример которого представлен в SEQ ID NO: 81, энхансер CMV, пример которого представлен в SEQ ID NO: 64, промотор СВА, пример которого представлен в SEQ ID NO: 50, химерный интрон, пример которого представлен в SEQ ID NO: 65, необязательно сайт клонирования, пример которого представлен в SEQ ID NO: 78, кодирующую анти-VEGF область, пример которой представлен в SEQ ID NO: 22, необязательно репортерную последовательность, пример которой представлен в SEQ ID NO: 104, необязательно сайт клонирования, пример которого представлен в SEQ ID NO: 79, сайт поли(A), пример которого представлен в SEQ ID NO: 75, необязательно сайт клонирования, пример которого представлен в SEQ ID NO: 82, и 3' ITR, пример которого представлен в SEQ ID NO: 48.

[0528] В некоторых вариантах осуществления конструкция имеет последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 95, эта конструкция может называться конструкцией гAAV-афлиберцепт-PC, является иллюстративным вариантом осуществления схемы, показанной на **фиг. 6, панель (D)**, и кодирует анти-VEGF белок афлиберцепт. В некоторых вариантах осуществления иллюстративная конструкция содержит: 5' ITR, пример которого представлен в SEQ ID NO: 47, необязательно сайт клонирования, пример которого представлен в SEQ ID NO: 81, энхансер CMV, пример которого представлен в SEQ ID NO: 64, промотор СВА, пример которого представлен в SEQ ID NO: 50, химерный интрон, пример которого представлен в SEQ ID NO: 65, необязательно сайт клонирования, пример которого представлен в SEQ ID NO: 78, кодирующую анти-VEGF область, пример которой представлен в SEQ ID NO: 42, необязательно сайт клонирования, пример которого представлен в SEQ ID NO: 79, сайт поли(A), пример которого представлен в SEQ ID NO:

75, необязательно сайт клонирования, пример которого представлен в SEQ ID NO: 82, и 3' ITR, пример которого представлен в SEQ ID NO: 48.

[0529] В некоторых вариантах осуществления конструкция имеет последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 96, эта конструкция может называться конструкцией гAAV-афлиберцепт, является иллюстративным вариантом осуществления схемы, показанной на **фиг. 6, панель (D)**, и кодирует анти-VEGF белок афлиберцепт. В некоторых вариантах осуществления иллюстративная конструкция содержит: 5' ITR, пример которого представлен в SEQ ID NO: 45, необязательно сайт клонирования, пример которого представлен в SEQ ID NO: 77, энхансер CMV, пример которого представлен в SEQ ID NO: 64, промотор CBA, пример которого представлен в SEQ ID NO: 49, химерный интрон, пример которого представлен в SEQ ID NO: 65, необязательно сайт клонирования, пример которого представлен в SEQ ID NO: 78, кодирующую анти-VEGF область, пример которой представлен в SEQ ID NO: 42, необязательно сайт клонирования, пример которого представлен в SEQ ID NO: 79, сайт поли(A), пример которого представлен в SEQ ID NO: 75, необязательно сайт клонирования, пример которого представлен в SEQ ID NO: 80, и 3' ITR, пример которого представлен в SEQ ID NO: 46.

[0530] В определенных вариантах осуществления частицы гAAVAnc80, содержащие конструкции, кодирующие анти-VEGF белки, были получены и использованы для оценки биологической активности и переносимости во внутреннем ухе указанных конструкций, чтобы подтвердить биологическую правдоподобность и обоснованную безопасность местной анти-VEGF терапии для лечения ВПЧ. В некоторых вариантах осуществления изобретения, такие оценки проводились посредством серии исследований с использованием следующих подходов/моделей: трансдукция и/или трансфекция клеточной линии, трансдукция и/или трансфекция кохлеарных эксплантатов; внутрикохлеарное введение и трансдукция клеток мышей дикого типа; и/или внутрикохлеарное введение и трансдукция клеток NHP. Сводные данные по определенным анти-VEGF частицам приведены в **таблице 1**.

[0531] **Таблица 1 - Краткий обзор частиц, используемых или планируемых для использования в определенных исследованиях**

Капсид	Промотор	Кодирующая последовательность ингибитора VEGF	Сигнал рА
AAVAnc80	CAG	Бевацизумаб	bGH

AAVAnc80	CAG	Ранибизумаб	bGH
AAVAnc80	CAG	Афлиберцепт	bGH

Сокращения: bGH = бычий гормон роста; CAG = ранний усиливающий элемент цитомегаловируса (CMV), последовательность гена куриного бета-актина (*CβA*), расположенная между 5' фланкирующей областью и проксимальной областью второго экзона, и 3' последовательность сплайсинга, полученная из гена кроличьего бета-глобина (*RβG*) (Miyazaki 1989; Niwa 1991; Orbán 2009, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки), которые вместе обычно называют промотором CAG; GLP = надлежащая лабораторная практика; pA = полиаденилирование.

[0532] Иллюстративная последовательность конструкции rAAV-ранибизумаб-PC (SEQ ID NO: 90)

CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCGTCTGGGCGACCTTTGGTCGCCC
GGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGG
GTTCTGCGGCCGACGCGTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAAT
TACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGT
AAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATGA
CGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCATTGACGTCAATGGGTGGACT
ATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGC
CCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGA
CCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCAT
GGGTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACC
CCCAATTTTGTATTTATTTATTTTAAATTATTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGG
GGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAG
GCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTA
TGCGGAGGCGGCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGGCGGGCGGG
AGTCGCTGCGTTGCCTTCGCCCCGTGCCCGCTCCGCGCCGCCTCGCGCCGCCCGCC
CCGGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCC
TCCGGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTTAATGACGGCTCGTTTCTTTTCTGTGGCTGCGT
GAAAGCCTTAAAGGGCTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGGAGCGGCTCGGGGG
GTGCGTGCGTGTGTGTGCGTGGGGAGCGCCGCGTGCGGCCCGCGCTGCCCGGCG
GCTGTGAGCGCTGCGGGCGCGGCGCGGGGCTTTGTGCGCTCCGCGTGTGCGCGAGG
GGAGCGCGGCCGGGGGCGGTGCCCGCGGTGCGGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAA
GGCTGCGTGCGGGGTGTGTGCGTGGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGCGGCGGT

CGGGCTGTAACCCCCCTGCACCCCCCTCCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCCGGCTT
CGGGTGCGGGGCTCCGTGCGGGGCGTGGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGGGG
TGCGGGCAGGTGGGGGTGCCGGGCGGGGCGGGGCCGCCTCGGGCCGGGGAGGGCT
CGGGGGAGGGGCGCGGGCGGCCCCCGGAGCGCCGGCGGGCTGTCGAGGGCGCGGGCAG
CCGCAGCCATTGCCTTTTATGGTAATCGTGCGAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTC
CCAAATCTGTGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCGCCGCACCCCCTCTAGCGGGC
GCGGGGCGAAGCGGTGCGGGCGCCGGCAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCG
TGCGTCGCCGCGCCGCCGTCCCCTTCTCCCTCTCCAGCCTCGGGGCTGTCCGCGGGG
GGACGGCTGCCTTCGGGGGGGACGGGGCAGGGCGGGGTTTCGGCTTCTGGCGTGTGA
CCGGCAGGCTCTAGAGCCTCTGCTAACCATGTTTCATGCCTTCTTCTTTTCTACAGCT
CCTGGGCAACGTGCTGGTTATTGTGACCGGTGCCACCATGTACCGGATGCAGCTGCT
GAGCTGTATCGCCCTGTCTCTGGCCCTGGTCACCAATTCTGAGGTGCAGCTGGTGGA
ATCTGGCGGCGGACTTGTCAACCTGGCGGCTCTCTGAGACTGAGCTGTGCCGCTTC
TGGCTACGACTTCACCCACTACGGCATGAACTGGGTCCGACAGGCCCCCTGGCAAAG
GCCTTGAATGGGTGCGGATGGATCAACACCTACACCGGCGAGCCAACATACGCCGCC
GACTTCAAGCGGAGATTCACCTTCAGCCTGGACACCAGCAAGAGCACCGCCTACCT
GCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAAGTATC
CCTACTACTACGGCACCCAGCCACTGGTACTTTGACGTGTGGGGACAGGGCACACTG
GTCACAGTGTCTAGCGCCTCTACAAAGGGCCCCAGCGTTTTCCCACTGGCTCCTAGC
AGCAAGTCTACCAGCGGAGGAACAGCCGCTCTGGGCTGTCTGGTCAAGGACTACTT
TCCCGAGCCTGTGACCGTGTCTGGAATTCTGGCGCTCTGACAAGCGGCGTGCACAC
CTTTCCAGCTGTGCTGCAAAGCAGCGGCCTGTACTCTCTGAGCAGCGTCGTGACAGT
GCCAAGCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAATGTGAACCACAAGCCTA
GCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACAC
CGGCAAGCGGAAGAGAAGAGGCTCTGGCGAAGGCAGAGGCAGCCTGCTTACATGT
GGCGACGTGGAAGAGAACCCCGGACCTATGTATAGAATGCAGCTCCTGTCCTGCAT
TGCCCTGAGCCTGGCTCTCGTGACCAACAGCGACATCCAGCTGACACAGAGCCCCA
GCAGCCTGTCTGCCTCTGTGGGAGACAGAGTGACCATCACCTGTAGCGCCAGCCAG
GACATCTCCAACCTGAACCTGGTATCAGCAAAAGCCCGGCAAGGCCCTAAGGT
GCTGATCTACTTCACAAGCAGCCTGCACTCCGGCGTGCCCAGCAGATTTTCTGGCTC
TGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGACCATATCTAGCCTGCAGCCTGAGGACTTCGC
CACCTACTACTGCCAGCAGTACAGCACCGTGCCTTGGACATTTGGCCAGGGCACAA
AGGTGGAAATCAAGCGGACTGTGGCCGCTCCTAGCGTGTTTCATCTTTCCACCTAGCG
ACGAGCAGCTGAAGTCTGGCACAGCCTCTGTGCGTGTGCCTGCTGAACAACCTTCTACC

CCAGAGAAGCCAAGGTGCAGTGGAAAGTGGACAATGCCCTGCAGAGCGGCAACAG
CCAAGAGAGCGTGACAGAGCAGGACTCCAAGGATAGCACCTATAGCCTGAGCAGCA
CCCTGACACTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAAGTGTACGCCTGCGAAGTG
ACCCACCAGGGCCTTTCTAGCCCTGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAATGTAA
GAGCTCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCC
CTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCTTTTCTAATAA
AATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGG
GTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGG
ATGCGGTGGGCTCTATGGAAGCTTGAATTCAGCTGACGTGCCTCGGACCGCTAGGA
ACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGC
CGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCG
AGCGAGCGCGCAG

**[0533] Иллюстративная последовательность конструкции rAAV-ранибизумаб
(SEQ ID NO: 91)**

TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCC
GGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGA
GGGAGTGGCCAACCTCCATCACTAGGGGTTCCTTTGTGACGCGGCCGCACGCGTGAC
ATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCC
CATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGC
CCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAA
TAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGG
CAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTA
AATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTACTTGGC
AGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGGTGAGGTGAGCCCCACGTTT
TGCTTCACTCTCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTTTGTATTTATTTATTT
TTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCC
GGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAG
CCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGG
CGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGGCGGGGAGTCGCTGCGTTGCCTTCGCC
CCGTGCCCCGCTCCGCGCCGCCTCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGTT
ACTCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCGCTT
GGTTTAATGACGGCTCGTTTCTTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTAAAGGGCTCCG
GGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCGTGTGTGTGTGC
GTGGGGAGCGCCGCGTGCGGCCCGCGCTGCCCGGGCGGCTGTGAGCGCTGCGGGGCGC

GGCGCGGGGCTTTGTGCGCTCCGCGTGTGCGCGAGGGGAGCGCGGCCGGGGGGCGGT
GCCCCGCGGTGCGGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAAGGCTGCGTGCGGGGTGTGTGC
GTGGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGCGGGCGGTTCGGGCTGTAACCCCCCTGC
ACCCCCCTCCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTGCGG
GGCGTGGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGGGGTGGCGGCAGGTGGGGGTGCC
GGGCGGGGCGGGGCCGCTCGGGCCGGGGAGGGCTCGGGGGAGGGGCGCGGGCGGC
CCCCGGAGCGCCGGCGGCTGTGAGGGCGCGGCAGCCGAGCCATTGCCTTTTATG
GTAATCGTGCGAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCCAAATCTGTGCGGAGCCGA
AATCTGGGAGGCGCCGCCGCACCCCCTCTAGCGGGCGCGGGGCGAAGCGGTGCGGC
GCCGGCAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTCGCCGCGCCGCGTCC
CCTTCTCCCTCTCCAGCCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGGACGGCTGCCTTCGGGGGGG
ACGGGGCAGGGCGGGGTTCGGCTTCTGGCGTGTGACCGGCGGCTCTAGAGCCTCTG
CTAACCATGTTTCATGCCTTCTTCTTTTTCTACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTTAT
TGTGACCGGTGCCACCATGTACCGGATGCAGCTGCTGAGCTGTATCGCCCTGTCTCT
GGCCCTGGTCACCAATTCTGAGGTGCAGCTGGTGGAAATCTGGCGGGCGGACTTGTTCA
ACCTGGCGGCTCTCTGAGACTGAGCTGTGCCGCTTCTGGCTACGACTTCACCCACTA
CGGCATGAACTGGGTCCGACAGGCCCTGGCAAAGGCCTTGAATGGGTCGGATGGA
TCAACACCTACACCGGCGAGCCAACATACGCCCGCGACTTCAAGCGGAGATTCACC
TTCAGCCTGGACACCAGCAAGAGCACCGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGC
CGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAAGTATCCCTACTACTACGGCACCAGCCA
CTGGTACTTTGACGTGTGGGGACAGGGCACACTGGTCACAGTGTCTAGCGCCTCTAC
AAAGGGCCCCAGCGTTTTTCCCCTGGCTCCTAGCAGCAAGTCTACCAGCGGAGGAA
CAGCCGCTCTGGGCTGTCTGGTCAAGGACTACTTTCCCGAGCCTGTGACCGTGTCTCT
GGAATTCTGGCGCTCTGACAAGCGGCGTGCACACCTTCCAGCTGTGCTGCAAAGCA
GCGGCCTGTACTCTCTGAGCAGCGTCGTGACAGTGCCAAGCAGCTCTCTGGGCACCC
AGACCTACATCTGCAATGTGAACCACAAGCCTAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAG
GTGGAACCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCGGCAAGCGGAAGAGAAGAGGCT
CTGGCGAAGGCAGAGGCAGCCTGCTTACATGTGGCGACGTGGAAGAGAACCCCGGA
CCTATGTATAGAATGCAGCTCCTGTCTGCATTGCCCTGAGCCTGGCTCTCGTGACC
AACAGCGACATCCAGCTGACACAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCCTCTGTGGGAGA
CAGAGTGACCATCACCTGTAGCGCCAGCCAGGACATCTCCAACCTGAACTGGT
ATCAGCAAAAGCCCGGCAAGGCCCTAAGGTGCTGATCTACTTACAAGCAGCCTG
CACTCCGGCGTGCCAGCAGATTTTCTGGCTCTGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTG
ACCATATCTAGCCTGCAGCCTGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTACAGC

ACCGTGCCTTGGACATTTGGCCAGGGCACAAAGGTGGAAATCAAGCGGACTGTGGC
CGCTCCTAGCGTGTTTCATCTTTCCACCTAGCGACGAGCAGCTGAAGTCTGGCACAGC
CTCTGTCGTGTGCCTGCTGAACAACCTTCTACCCCAGAGAAGCCAAGGTGCAGTGGAA
AGTGGACAATGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAAGAGAGCGTGACAGAGCAGGAC
TCCAAGGATAGCACCTATAGCCTGAGCAGCACCCCTGACACTGAGCAAGGCCGACTA
CGAGAAGCACAAAGTGTACGCCTGCGAAGTGACCCACCAGGGCCTTTCTAGCCCTG
TGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAATGTTAAGAGCTCGCTGATCAGCCTCGACTG
TGCCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCT
GGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCCTTTCCTAATAAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTG
TCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGG
AGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGAAGCT
TGAATTCAGCTGACGTGCCTCGGACCGCCTAGGAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTG
GCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTGCC
CGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGG
AGTGGCCAA

**[0534] Иллюстративная последовательность конструкции rAAV-ранибизумаб.2
(SEQ ID NO: 92)**

TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCC
GGGCGTCGGGCGACCTTTGGTTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGA
GGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCTTTGTTCGACGCGGCCGCACGCGTGAC
ATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCC
CATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGC
CCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAA
TAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGG
CAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTA
AATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGC
AGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGGTTCGAGGTGAGCCCCACGTTC
TGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCAATTTTGTATTTATTTATTT
TTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGG
GCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCA
ATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGGCGG
CCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGGCGGGGAGTCGCTGCGTTGCCTTCGCCCCG
TGCCCCGCTCCGCGCCGCCTCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGTTACT
CCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCGCTTGGT

TTAATGACGGCTCGTTTCTTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTAAAGGGCTCCGGGA
GGGCCCTTTGTGCGGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCGTGTGTGTGTGCGTG
GGGAGCGCCGCGTGC GGCCCGCGCTGCCCGGCGGCTGTGAGCGCTGCGGGCGCGGC
GCGGGGCTTTGTGCGCTCCGCGTGTGCGCGAGGGGAGCGCGGCCGGGGGCGGTGCC
CCGCGGTGCGGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAAGGCTGCGTGCGGGGTGTGTGCGTG
GGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGCGGCGGTGCGGGCTGTAACCCCCCTGCACC
CCCCTCCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTGCGGGGC
GTGGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGGGGTGGCGGCAGGTGGGGGTGCCGGG
CGGGGCGGGGCCGCCTCGGGCCGGGGAGGGCTCGGGGGAGGGGCGCGGCGGCCCC
CGGAGCGCCGGCGGCTGTGAGGCGCGGCGAGCCGCAGCCATTGCCTTTTATGGTA
ATCGTGCGAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCAAATCTGTGCGGAGCCGAAAT
CTGGGAGGCGCCGCCGCACCCCCTCTAGCGGGCGCGGGGCGAAGCGGTGCGGCGCC
GGCAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTCGCCGCGCCGCGTCCCCT
TCTCCCTCTCCAGCCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGGACGGCTGCCTTCGGGGGGGACG
GGGCAGGGCGGGGTTTCGGCTTCTGGCGTGTGACCGGCGGCTCTAGAGCCTCTGCTA
ACCATGTTTCATGCCTTCTTCTTTTCTACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTTATTGT
GACCGGTGCCACCATGTACCGGATGCAGCTGCTGAGCTGTATCGCCCTGTCTCTGGC
CCTGGTCACCAATTCTGAGGTGCAGCTGGTGGAAATCTGGCGGCGGACTTGTTCAACC
TGCGGGCTCTCTGAGACTGAGCTGTGCCGCTTCTGGCTACGACTTCACCCACTACGG
CATGAACTGGGTCCGACAGGCCCTGGCAAAGGCCTTGAATGGGTCCGATGGATCA
ACACCTACACCGGCGAGCCAAACATACGCCCGCGACTTCAAGCGGAGATTCACCTTC
AGCCTGGACACCAGCAAGAGCACCGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGA
GGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAAGTATCCCTACTACTACGGCACCCAGCCACTG
GTACTTTGACGTGTGGGGACAGGGCACACTGGTCACAGTGTCTAGCGCCTCTACAAA
GGGCCCCAGCGTTTTTCCACTGGCTCCTAGCAGCAAGTCTACCAGCGGAGGAACAG
CCGCTCTGGGCTGTCTGGTCAAGGACTACTTTCCCGAGCCTGTGACCGTGTCTGGA
ATTCTGGCGCTCTGACAAGCGGCGTGCACACCTTTCCAGCTGTGCTGCAAAGCAGCG
GCCTGTACTCTCTGAGCAGCGTCGTGACAGTGCCAAGCAGCTCTCTGGGCACCCAGA
CCTACATCTGCAATGTGAACCACAAGCCTAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTG
GAACCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCGGCAAGCGGAAGAGAAGAGGCTCTG
GCGAAGGCAGAGGCAGCCTGCTTACATGTGGCGACGTGGAAGAGAACCCCGGACCT
ATGTATAGAATGCAGCTCCTGTCTGCAATTGCCCTGAGCCTGGCTCTCGTGACCAAC
AGCGACATCCAGCTGACACAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCCTCTGTGGGAGACAG
AGTGACCATCACCTGTAGCGCCAGCCAGGACATCTCCAACCTGAACTGGTATCA

GCAAAAGCCCCGGCAAGGCCCTAAGGTGCTGATCTACTTCACAAGCAGCCTGCACT
CCGGCGTGCCCAGCAGATTTTCTGGCTCTGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGACCA
TATCTAGCCTGCAGCCTGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTACAGCACCG
TGCCTTGGACATTTGGCCAGGGCACAAAGGTGGAAATCAAGCGGACTGTGGCCGCT
CCTAGCGTGTTTCATCTTTCCACCTAGCGACGAGCAGCTGAAGTCTGGCACAGCCTCT
GTCGTGTGCCTGCTGAACAACCTTCTACCCCAGAGAAGCCAAGGTGCAGTGGAAAGT
GGACAATGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAAGAGAGCGTGACAGAGCAGGACTCC
AAGGATAGCACCTATAGCCTGAGCAGCACCTGACACTGAGCAAGGCCGACTACGA
GAAGCACAAAGTGTACGCCTGCGAAGTGACCCACCAGGGCCTTTCTAGCCCTGTGA
CCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAATGTTAAGAGCTCGCTGATCAGCCTCGACTGTGC
CTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGA
AGGTGCCACTCCCCTGTCCTTTCCCTAATAAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCT
GAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGG
ATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGAAGCTTGA
ATTCAGCTGACGTGCCTCGGACCGCCTAGGAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCC
ACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCCGA
CGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGT
GGCCAA

**[0535] Иллюстративная последовательность конструкции rAAV-ранибизумаб-
GFP (SEQ ID NO: 106)**

CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCC
GGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGG
GTTCTGCGGCCGCACGCGTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAAT
TACGGGGTCATTAGTTCATAGCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGT
AAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATGA
CGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGACT
ATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGC
CCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGA
CCTTATGGGACTTTCCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCAT
GGGTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACC
CCCAATTTTGTATTTATTTATTTTAAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGG
GGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAG
GCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTA
TGCGGAGGCGGCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGCGGGCGGG

AGTCGCTGCGTTGCCTTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCGCCGCTCGCGCCGCCCGCC
CCGGCTCTGACTGACCGCGTACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCC
TCCGGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTAATGACGGCTCGTTTCTTTTCTGTGGCTGCGT
GAAAGCCTTAAAGGGCTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGGGAGCGGCTCGGGGG
GTGCGTGCGTGTGTGTGTGCGTGGGGAGCGCCGCGTGCGGCCCGCGCTGCCCGGCG
GCTGTGAGCGCTGCGGGCGCGGCGCGGGGCTTTGTGCGCTCCGCGTGTGCGCGAGG
GGAGCGCGGCCGGGGGGCGGTGCCCGCGGTGCGGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAA
GGCTGCGTGCGGGGTGTGTGCGTGGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGCGGCGGT
CGGGCTGTAACCCCCCTGCACCCCCCTCCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCCGGCTT
CGGGTGCGGGGCTCCGTGCGGGGCGTGGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGGGG
TGCGGCGAGGTGGGGGTGCCGGGCGGGGCGGGGCCGCTCGGGCCGGGGAGGGCT
CGGGGGAGGGGCGCGGCGGCCCCCCGGAGCGCCGGCGGCTGTCGAGGCGCGGCGAG
CCGCAGCCATTGCCTTTTATGGTAATCGTGCGAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTC
CCAAATCTGTGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCGCCGCACCCCCTCTAGCGGGC
GCGGGGCGAAGCGGTGCGGCGCCGGCAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCG
TGCCTCGCCGCGCCGCGTCCCCTTCTCCCTCTCCAGCCTCGGGGCTGTCCGCGGGG
GGACGGCTGCCTTCGGGGGGGACGGGGCAGGGCGGGGTTCCGGCTTCTGGCGTGTGA
CCGGCGGCTCTAGAGCCTCTGCTAACCATGTTTCATGCCTTCTTCTTTTCTACAGCT
CCTGGGCAACGTGCTGGTTATTGTGACCGGTGCCACCATGTACCGGATGCAGCTGCT
GAGCTGTATCGCCCTGTCTCTGGCCCTGGTCACCAATTCTGAGGTGCAGCTGGTGGA
ATCTGGCGGGCGGACTTGTTCAACCTGGCGGCTCTCTGAGACTGAGCTGTGCCGCTTC
TGGCTACGACTTCACCCACTACGGCATGAACTGGGTCCGACAGGCCCTGGCAAAG
GCCTTGAATGGGTCGGATGGATCAACACCTACACCGGCGAGCCAACATACGCCGCC
GACTTCAAGCGGAGATTCACCTTCAGCCTGGACACCAGCAAGAGCACCGCCTACCT
GCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAAGTATC
CCTACTACTACGGCACCCAGCCACTGGTACTTTGACGTGTGGGGACAGGGCACACTG
GTCACAGTGTCTAGCGCCTCTACAAAGGGCCCCAGCGTTTTCCCACTGGCTCCTAGC
AGCAAGTCTACCAGCGGAGGAACAGCCGCTCTGGGCTGTCTGGTCAAGGACTACTT
TCCCGAGCCTGTGACCGTGTCCCTGGAATTCTGGCGCTCTGACAAGCGGCGTGCACAC
CTTTCCAGCTGTGCTGCAAAGCAGCGGCCTGTACTCTCTGAGCAGCGTCGTGACAGT
GCCAAGCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAATGTGAACCACAAGCCTA
GCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACAC
CGGCAAGCGGAAGAGAAGAGGCTCTGGCGAAGGCAGAGGCAGCCTGCTTACATGT
GGCGACGTGGAAGAGAACCCCGGACCTATGTATAGAATGCAGCTCCTGTCTGCAT

TGCCCTGAGCCTGGCTCTCGTGACCAACAGCGACATCCAGCTGACACAGAGCCCCA
GCAGCCTGTCTGCCTCTGTGGGAGACAGAGTGACCATCACCTGTAGCGCCAGCCAG
GACATCTCCAACCTGAACCTGGTATCAGCAAAAGCCC GGCAAGGCCCTAAGGT
GCTGATCTACTTCACAAGCAGCCTGCACTCCGGCGTGCCCAGCAGATTTTCTGGCTC
TGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGACCATATCTAGCCTGCAGCCTGAGGACTTCGC
CACCTACTACTGCCAGCAGTACAGCACCGTGCCTTGGACATTTGGCCAGGGCACA
AGGTGGAAATCAAGCGGACTGTGGCCGCTCCTAGCGTGTTTCATCTTTCCACCTAGCG
ACGAGCAGCTGAAGTCTGGCACAGCCTCTGTCTGTGCCTGCTGAACAACCTTCTACC
CCAGAGAAGCCAAGGTGCAGTGGAAAGTGGACAATGCCCTGCAGAGCGGCAACAG
CCAAGAGAGCGTGACAGAGCAGGACTCCAAGGATAGCACCTATAGCCTGAGCAGCA
CCCTGACACTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAAGTGTACGCCTGCGAAGTG
ACCCACCAGGGCCTTTCTAGCCCTGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAATGTATG
GTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTTCGAGCTGGA
CGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCA
CCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCT
GGCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCG
ACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAG
GAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAA
GTTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGG
AGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACGTC
TATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCA
CAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCA
TCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCC
TGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACC
GCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAGAGCTCGCTGATCA
GCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCCTCCCCCGTGCCTT
CCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTG
CATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACA
GCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTC
TATGGAAGCTTGAATTCAGCTGACGTGCCTCGGACCGCTAGGAACCCCTAGTGATGG
AGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGG
TCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAG

**[0536] Иллюстративная последовательность конструкции rAAV-бевацизумаб-PC
(SEQ ID NO: 93)**

CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCGTCGGGGCGACCTTTGGTCGCCC
GGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCACTAGGG
GTTCTGCGGCCGCACGCGTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAAT
TACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGGTTACATAACTTACGGT
AAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATGA
CGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGACT
ATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGC
CCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGA
CCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCAT
GGGTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACC
CCCAATTTTGTATTTATTTATTTTTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGG
GGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAG
GCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTA
TGCGGAGGCGGCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGGCGGGCGGG
AGTCGCTGCGTTGCCTTCGCCCCGTGCCCGCTCCGCGCCGCTCGCGCCGCCCGCC
CCGGCTCTGACTGACCGCGTACTCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCC
TCCGGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTTAATGACGGCTCGTTTCTTTTCTGTGGCTGCGT
GAAAGCCTTAAAGGGCTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGGAGCGGCTCGGGGG
GTGCGTGCGTGTGTGTGTGCGTGGGGAGCGCCGCGTGCGGCCCGCGCTGCCCGGCG
GCTGTGAGCGCTGCGGGCGCGGCGCGGGGCTTTGTGCGCTCCGCGTGTGCGCGAGG
GGAGCGCGGCCGGGGGCGGTGCCCGCGGTGCGGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAA
GGCTGCGTGCGGGGTGTGTGCGTGGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGCGGCGGT
CGGGCTGTAACCCCCCTGCACCCCCCTCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCGGCTT
CGGGTGCGGGGCTCCGTGCGGGGCGTGGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGGGG
TGCGGCAGGTGGGGGTGCCGGGCGGGGCGGGGCCGCTCGGGCCGGGGAGGGCT
CGGGGGAGGGGCGCGGCGGCCCGGAGCGCCGGCGGCTGTCGAGGCGCGGCGAG
CCGCAGCCATTGCCTTTTATGGTAATCGTGCAGAGGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTC
CCAAATCTGTGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCGCCGCACCCCTCTAGCGGGC
GCGGGGCGAAGCGGTGCGGCGCCGCGCAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCG
TGCGTCGCCGCGCCGCGTCCCCTTCTCCCTCTCCAGCTCGGGGCTGTCCGCGGGG
GGACGGCTGCCTTCGGGGGGGACGGGGCAGGGCGGGGTTTCGGCTTCTGGCGTGTGA
CCGGCGGCTCTAGAGCCTCTGCTAACCATGTTTCATGCCTTCTTCTTTTCTACAGCT
CCTGGGCAACGTGCTGGTTATTGTGACCGGTGCCACCATGTACCGGATGCAGCTGCT
GAGCTGTATCGCCCTGTCTCTGGCCCTGGTCACCAATTCTGAGGTGCAGCTGGTGGA

ATCTGGCGGGCGGACTTGTTC AACCTGGCGGCTCTCTGAGACTGAGCTGTGCCGCTTC
TGGCTACACCTTCACCAACTACGGCATGAACTGGGTCCGACAGGCCCTGGCAAAG
GCCTTGAATGGGTCGGATGGATCAACACCTACACCGGCGAGCCAACATACGCCGCC
GACTTCAAGCGGAGATTACCTTCAGCCTGGACACCAGCAAGAGCACCGCCTACCT
GCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAAGTATC
CCCACTACTACGGCAGCAGCCACTGGTACTTTGACGTGTGGGGACAGGGCACACTG
GTCACAGTGTCTAGCGCCTCTACAAAGGGCCCCAGCGTTTTTCCCACTGGCTCCTAGC
AGCAAGTCTACCAGCGGAGGAACAGCCGCTCTGGGCTGTCTGGTCAAGGACTACTT
TCCCGAGCCTGTGACCGTGTCTGGAATTCTGGCGCTCTGACAAGCGGCGTGCACAC
CTTTCCAGCTGTGCTGCAAAGCAGCGGCCTGTACTCTCTGAGCAGCGTCGTGACAGT
GCCAAGCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAATGTGAACCACAAGCCTA
GCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACAC
CTGTCCTCCATGTCCTGCTCCAGA ACTGCTCGGCGGACCTTCCGTGTTCTGTTTCT
CCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGT
GGTGGATGTGTCCCACGAGGATCCC GAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCG
TGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTACAACAGCACCTA
CAGAGTGGTGTCCGTGCTGACCGT GCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGT
ACAAGTGAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCTCCTATCGAGAAAACCATCAGC
AAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACCC CAGGTTTACACACTGCCTCCAAGCCGGGA
AGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTCGTGAAGGGCTTCTACCCTTC
CGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAATGGCCAGCCAGAGAACA ACTACAAGACA
ACCCCTCCTGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTTCTGTACAGCAAGCTGACAGTG
GACAAGTCCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTT CAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGC
CCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCTCTGAGCCTGTCTCCTGGCAAGCGGAAGA
GAAGAGGCTCTGGCGAAGGCAGAGGCAGCCTGCTTACATGTGGCGACGTGGAAGAG
AACCCCGGACCTATGTATAGAATGCAGCTCCTGTCCTGCATTGCCCTGAGCCTGGCT
CTCGTGACCAACAGCGACATCCAGATGACACAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCCTCT
GTGGGAGACAGAGTGACCATCACCTGTAGCGCCAGCCAGGACATCTCCA ACTACCT
GAACTGGTATCAGCAAAAGCCCGGCAAGGCCCTAAGGTGCTGATCTACTTCACAA
GCAGCCTGCACTCCGGCGTGCC CAGCAGATTTTCTGGCTCTGGCAGCGGCACCGACT
TCACCCTGACCATATCTAGCCTGCAGCCTGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGC
AGTACAGCACCGTGCCTTGGACATTTGGCCAGGGCACAAAGGTGGAAATCAAGCGG
ACTGTGGCCGCTCCTAGCGTGTTCATCTTTCCACCTAGCGACGAGCAGCTGAAGTCT
GGCACAGCCTCTGTCTGTGCCTGCTGAACA ACTTCTACCCAGAGAAGCCAAGGTG

CAGTGGAAAGTGGACAATGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAAGAGAGCGTGACAG
AGCAGGACTCCAAGGATAGCACCTATAGCCTGAGCAGCACCTGACACTGAGCAAG
GCCGACTACGAGAAGCACAAAGTGTACGCCTGCGAAGTGACCCACCAGGGCCTTTC
TAGCCCTGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAATGTTAAGAGCTCGCTGATCAGC
CTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCC
TTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCA
TCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGC
AAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTAT
GGAAGCTTGAATTCAGCTGACGTGCCTCGGACCGCTAGGAACCCCTAGTGATGGAG
TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTC
GCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAG

**[0537] Иллюстративная последовательность конструкции rAAV-бевацизумаб
(SEQ ID NO: 94)**

TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCC
GGGCGTCGGGCGACCTTTGGTGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGA
GGGAGTGGCCAACCTCCATCACTAGGGGTTCCTTTGTGACGCGGCCGCACGCGTGAC
ATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCC
CATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGC
CCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAA
TAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGG
CAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTA
AATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGC
AGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGGTCGAGGTGAGCCCCACGTTC
TGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCTCCCCACCCCAATTTTGTATTTATTTATTTT
TTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGGC
GGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAG
CCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGG
CGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGGCGGGGAGTCGCTGCGTTGCCTTCGCC
CCGTGCCCCGCTCCGCGCCGCCTCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGTT
ACTCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCGCTT
GGTTTAATGACGGCTCGTTTCTTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTAAAGGGCTCCG
GGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCGTGTGTGTGTGC
GTGGGGAGCGCCGCGTGCGGCCCGCGCTGCCCGGCGGCTGTGAGCGCTGCGGGCGC
GGCGCGGGGCTTTGTGCGCTCCGCGTGTGCGCGAGGGGAGCGCGGCCGGGGGCGGT

GCCCCGCGGTGCGGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAAGGCTGCGTGCGGGGTGTGTGC
GTGGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGCGGCGGTTCGGGCTGTAACCCCCCCTGC
ACCCCCCTCCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTGCGG
GGCGTGGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGGGGTGGCGGCAGGTGGGGGTGCC
GGGCGGGGCGGGGCCGCCTCGGGCCGGGGAGGGCTCGGGGGAGGGGCGCGGGCGGC
CCCCGGAGCGCCGGCGGCTGTGAGGCGCGGCAGCCGAGCCATTGCCTTTTATG
GTAATCGTGCGAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCCAAATCTGTGCGGAGCCGA
AATCTGGGAGGCGCCGCCGCACCCCCTCTAGCGGGCGCGGGGCGAAGCGGTGCGGC
GCCGGCAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTCGCCGCGCCGCGTCC
CCTTCTCCCTCTCCAGCCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGGACGGCTGCCTTCGGGGGGG
ACGGGGCAGGGCGGGGTTCGGCTTCTGGCGTGTGACCGGCGGCTCTAGAGCCTCTG
CTAACCATGTTTCATGCCTTCTTTTCTTTTCTACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTTAT
TGTGACCGGTGCCACCATGTACCGGATGCAGCTGCTGAGCTGTATCGCCCTGTCTCT
GGCCCTGGTCACCAATTCTGAGGTGCAGCTGGTGGAAATCTGGCGGCGGACTTGTTCA
ACCTGGCGGCTCTCTGAGACTGAGCTGTGCCGCTTCTGGCTACACCTTCACCAACTA
CGGCATGAACTGGGTCCGACAGGCCCTGGCAAAGGCCTTGAATGGGTTCGGATGGA
TCAACACCTACACCGGCGAGCCAAACATACGCCGCCGACTTCAAGCGGAGATTCACC
TTCAGCCTGGACACCAGCAAGAGCACCGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGC
CGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAAGTATCCCCACTACTACGGCAGCAGCC
ACTGGTACTTTGACGTGTGGGGACAGGGCACACTGGTCCACAGTGTCTAGCGCCTCTA
CAAAGGGCCCCAGCGTTTTTCCACTGGCTCCTAGCAGCAAGTCTACCAGCGGAGGA
ACAGCCGCTCTGGGCTGTCTGGTCAAGGACTACTTTCCCGAGCCTGTGACCGTGTCC
TGGAATTCTGGCGCTCTGACAAGCGGCGTGCACACCTTTCCAGCTGTGCTGCAAAGC
AGCGGCCTGTACTCTCTGAGCAGCGTCGTGACAGTGCCAAGCAGCTCTCTGGGCACC
CAGACCTACATCTGCAATGTGAACCACAAGCCTAGCAACACCAAGGTGGACAAGAA
GGTGGAAACCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGTCCTCCATGTCCTGCTCCAG
AACTGCTCGGCGGACCTTCCGTGTTCTGTTTCTCCAAAGCCTAAGGACACCCTGA
TGATCAGCAGAACCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCCACGAGGAT
CCCGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGAC
CAAGCCTAGAGAGGAACAGTACAACAGCACCTACAGAGTGGTGTCCGTGCTGACCG
TGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAG
GCCCTGCCTGCTCCTATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGA
ACCCAGGTTTACACACTGCCTCCAAGCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGT
CCCTGACCTGCCTCGTGAAGGGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGA

GCAATGGCCAGCCAGAGAACAACACTACAAGACAACCCCTCCTGTGCTGGACAGCGAC
GGCTCATTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACAGTGGACAAGTCCAGATGGCAGCAGGG
CAACGTGTTAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGA
AGTCTCTGAGCCTGTCTCCTGGCAAGCGGAAGAGAAGAGGCTCTGGCGAAGGCAGA
GGCAGCCTGCTTACATGTGGCGACGTGGAAGAGAACCCCGGACCTATGTATAGAAT
GCAGCTCCTGTCTGCATTGCCCTGAGCCTGGCTCTCGTGACCAACAGCGACATCCA
GATGACACAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCCTCTGTGGGAGACAGAGTGACCATCA
CCTGTAGCGCCAGCCAGGACATCTCCAACACTGAACTGGTATCAGCAAAGCCC
GGCAAGGCCCTAAGGTGCTGATCTACTTCACAAGCAGCCTGCACTCCGGCGTGCCC
AGCAGATTTTCTGGCTCTGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGACCATATCTAGCCTG
CAGCCTGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTACAGCACCGTGCCTTGGACA
TTTGGCCAGGGCACAAAGGTGGAAATCAAGCGGACTGTGGCCGCTCCTAGCGTGTT
CATCTTTCCACCTAGCGACGAGCAGCTGAAGTCTGGCACAGCCTCTGTCGTGTGCCT
GCTGAACAACCTTCTACCCCAGAGAAGCCAAGGTGCAGTGGAAAGTGGACAATGCCC
TGCAGAGCGGCAACAGCCAAGAGAGCGTGACAGAGCAGGACTCCAAGGATAGCAC
CTATAGCCTGAGCAGCACCTGACACTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAAG
TGTACGCCTGCGAAGTGACCCACCAGGGCCTTTCTAGCCCTGTGACCAAGAGCTTCA
ACCGGGGCGAATGTAAAGAGCTCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCA
GCCATCTGTTGTTTGCCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCC
ACTGTCCTTTCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCAT
TCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACA
ATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGAAGCTTGAATTCAGCTGACG
TGCCTCGGACCGCCTAGGAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGC
GCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCCGACGCCCGGGCTTT
GCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAA

**[0538] Иллюстративная последовательность конструкции rAAV-бевацизумаб-
GFP (SEQ ID NO: 107)**

CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCGTGGGGCGACCTTTGGTCGCCC
GGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGG
GTTCTGCGGCCGCACGCGTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAAT
TACGGGGTCATTAGTTCATAGCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGT
AAATGGCCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGA
CGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGACT
ATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGC

CCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGA
CCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCAT
GGGTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACC
CCCAATTTTGTATTTATTTATTTTTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGG
GGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAG
GCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTA
TGCGGAGGCGGCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGGCGGGCGGG
AGTCGCTGCGTTGCCTTCGCCCCGTGCCCGCTCCGCGCCGCTCGCGCCGCCGCC
CCGGCTCTGACTGACCGCGTACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCC
TCCGGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTAATGACGGCTCGTTTCTTTTCTGTGGCTGCGT
GAAAGCCTTAAAGGGCTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGGAGCGGCTCGGGGG
GTGCGTGCGTGTGTGTGTGCGTGGGGAGCGCCGCGTGCGGCCCGCGCTGCCCGGCG
GCTGTGAGCGCTGCGGGCGCGGCGCGGGGCTTTGTGCGCTCCGCGTGTGCGCGAGG
GGAGCGCGGCCGGGGGCGGTGCCCGCGGTGCGGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAA
GGCTGCGTGCGGGGTGTGTGCGTGGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGCGGCGGT
CGGGCTGTAACCCCCCTGCACCCCCCTCCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCGGCTT
CGGGTGCGGGGCTCCGTGCGGGGCGTGGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGGGG
TGCGGCGAGGTGGGGGTGCCGGGCGGGGCGGGGCCGCTCGGGCCGGGGAGGGCT
CGGGGGAGGGGCGCGGCGGCCCCCCGGAGCGCCGGCGGCTGTCGAGGCGCGGCGAG
CCGCAGCCATTGCCTTTTATGGTAATCGTGCGAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTC
CCAAATCTGTGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCGCCGCACCCCCTCTAGCGGGC
GCGGGGCGAAGCGGTGCGGCGCCGCGCAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCG
TGCGTCGCCGCGCCGCGTCCCCTTCTCCCTCTCCAGCCTCGGGGCTGTCCGCGGGG
GGACGGCTGCCTTCGGGGGGGACGGGGCAGGGCGGGGTTCCGGCTTCTGGCGTGTGA
CCGGCGGCTCTAGAGCCTCTGCTAACCATGTTTCATGCCTTCTTTTCTTCTACAGCT
CCTGGGCAACGTGCTGGTTATTGTGACCGGTGCCACCATGTACCGGATGCAGCTGCT
GAGCTGTATCGCCCTGTCTCTGGCCCTGGTCACCAATTCTGAGGTGCAGCTGGTGGA
ATCTGGCGGCGGACTTGTTC AACCTGGCGGCTCTCTGAGACTGAGCTGTGCCGCTTC
TGGCTACACCTTCACCAACTACGGCATGAACTGGGTCCGACAGGCCCCCTGGCAAAG
GCCTTGAATGGGTCGGATGGATCAACACCTACACCGGCGAGCCAACATACGCCGCC
GACTTCAAGCGGAGATTCACCTTCAGCCTGGACACCAGCAAGAGCACCGCCTACCT
GCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAAGTATC
CCCACTACTACGGCAGCAGCCACTGGTACTTTGACGTGTGGGGACAGGGCACACTG
GTCACAGTGTCTAGCGCCTCTACAAAGGGCCCCAGCGTTTTCCCACTGGCTCCTAGC

AGCAAGTCTACCAGCGGAGGAACAGCCGCTCTGGGCTGTCTGGTCAAGGACTACTT
TCCCGAGCCTGTGACCGTGTCTGGAATTCTGGCGCTCTGACAAGCGGCGTGCACAC
CTTTCCAGCTGTGCTGCAAAGCAGCGGCCTGTACTCTCTGAGCAGCGTCGTGACAGT
GCCAAGCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAATGTGAACCACAAGCCTA
GCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACAC
CTGTCCTCCATGTCTGCTCCAGAACTGCTCGGCGGACCTTCCGTGTTCTGTTTCT
CCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGT
GGTGGATGTGTCCCACGAGGATCCCGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCG
TGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTACAACAGCACCTA
CAGAGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGT
ACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCTCCTATCGAGAAAACCATCAGC
AAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACCCAGGTTTACACACTGCCTCCAAGCCGGGA
AGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTCGTGAAGGGCTTCTACCCTTC
CGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAATGGCCAGCCAGAGAACAACACTACAAGACA
ACCCCTCCTGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTTCTGTACAGCAAGCTGACAGTG
GACAAGTCCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTTCACTGCTGCAGCGTGATGCACGAGGC
CCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCTCTGAGCCTGTCTCCTGGCAAGCGGAAGA
GAAGAGGCTCTGGCGAAGGCAGAGGCAGCCTGCTTACATGTGGCGACGTGGAAGAG
AACCCCGGACCTATGTATAGAATGCAGCTCCTGTCCTGCATTGCCCTGAGCCTGGCT
CTCGTGACCAACAGCGACATCCAGATGACACAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCCTCT
GTGGGAGACAGAGTGACCATCACCTGTAGCGCCAGCCAGGACATCTCCAACACTACCT
GAACTGGTATCAGCAAAAGCCCGGCAAGGCCCTAAGGTGCTGATCTACTTCACAA
GCAGCCTGCACTCCGGCGTGCCAGCAGATTTTCTGGCTCTGGCAGCGGCACCGACT
TCACCCTGACCATATCTAGCCTGCAGCCTGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGC
AGTACAGCACCGTGCCTTGGACATTTGGCCAGGGCACAAAGGTGGAAATCAAGCGG
ACTGTGGCCGCTCCTAGCGTGTTTCACTTTCCACCTAGCGACGAGCAGCTGAAGTCT
GGCACAGCCTCTGTGCTGTGCCTGCTGAACAACCTTCTACCCAGAGAAGCCAAGGTG
CAGTGGAAGTGGACAATGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAAGAGAGCGTGACAG
AGCAGGACTCCAAGGATAGCACCTATAGCCTGAGCAGCACCCCTGACACTGAGCAAG
GCCGACTACGAGAAGCACAAAGTGTACGCCTGCGAAGTGACCCACCAGGGCCTTTC
TAGCCCTGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAATGTATGGTGAGCAAGGGCGAGG
AGCTGTTTACCAGGGGTGGTGCCATCCTGGTTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGC
CACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGAC
CCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCTGGCCACCCTCGTGAC

CACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGC
ACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCT
TCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACC
CTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCT
GGGGCACAAGCTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACA
AGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGC
AGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGT
GCTGCTGCCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCA
ACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACT
CTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAGAGCTCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTT
CTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGG
TGCCACTCCCCTGTCTTTCCTAATAAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAG
TAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATT
GGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGAAGCTTGAATT
CAGCTGACGTGCCTCGGACCGCTAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTC
TCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCCGACGCCCGG
GCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAG

**[0539] Иллюстративная последовательность конструкции rAAV-афлиберцепт-PC
(SEQ ID NO: 95)**

CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCGTCCGGGCGACCTTTGGTCGCCC
GGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGG
GTTCTGCGGCCGCACGCGTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAAT
TACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGT
AAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGA
CGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCATTGACGTCAATGGGTGGACT
ATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGC
CCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGA
CCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCAT
GGGTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACC
CCCAATTTTGTATTTATTTATTTTAAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGGCGGGGGG
GGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAG
GCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTA
TGCGGAGGCGGCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGGCGGGCGGG
AGTCGCTGCGTTGCCTTCGCCCCGTGCCCGCTCCGCGCCGCCTCGCGCCGCCCGCC

CCGGCTCTGACTGACCGCGTACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCC
TCCGGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTTAATGACGGCTCGTTTCTTTTCTGTGGCTGCGT
GAAAGCCTTAAAGGGCTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGGGAGCGGCTCGGGGG
GTGCGTGCCTGTGTGTGTGCGTGGGGAGCGCCGCGTGCGGCCCGCGCTGCCCGGCG
GCTGTGAGCGCTGCGGGCGCGGCGCGGGGCTTTGTGCGCTCCGCGTGTGCGCGAGG
GGAGCGCGGCCGGGGGGCGGTGCCCCGCGGTGCGGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAA
GGCTGCGTGCGGGGTGTGTGCGTGGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGCGGCGGT
CGGGCTGTAACCCCCCTGCACCCCCCTCCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCGGCTT
CGGGTGCGGGGCTCCGTGCGGGGCGTGGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGGGG
TGCGGCGAGGTGGGGGTGCCGGGCGGGGCGGGGCCGCCTCGGGCCGGGGAGGGCT
CGGGGGAGGGGCGCGGCGGCCCGGAGCGCCGGCGGCTGTCGAGGGCGCGGCGAG
CCGCAGCCATTGCCTTTTATGGTAATCGTGCAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTC
CCAAATCTGTGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCGCCGCACCCCCTCTAGCGGGC
GCGGGGCGAAGCGGTGCGGCGCCGGCAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCG
TGCGTCGCCGCGCCGCGTCCCCTTCTCCCTCTCCAGCCTCGGGGCTGTCCGCGGGG
GGACGGCTGCCTTCGGGGGGGACGGGGCAGGGCGGGGTTCGGCTTCTGGCGTGTGA
CCGGCGGCTCTAGAGCCTCTGCTAACCATGTTTCATGCCTTCTTCTTTTCTACAGCT
CCTGGGCAACGTGCTGGTTATTGTGACCGGTGCCACCATGTACCGGATGCAGCTGCT
GAGCTGTATCGCCCTGTCTCTGGCCCTGGTCACCAATTCTAGCGATACCGGCAGACC
CTTCGTGGAAATGTACAGCGAGATCCCCGAGATCATCCACATGACCGAGGGCAGAG
AGCTGGTCATCCCCTGCAGAGTGACAAGCCCCAACATCACCGTGACTCTGAAGAAG
TTCCCTCTGGACACACTGATCCCCGACGGCAAGAGAATCATCTGGGACAGCCGGAA
GGGCTTCATCATCAGCAACGCCACCTACAAAGAGATCGGCCTGCTGACCTGTGAAG
CCACCGTGAATGGCCACCTGTACAAGACCAACTACCTGACACACAGACAGACCAAC
ACCATCATCGACGTGGTGCTGAGCCCTAGCCACGGCATTGAACTGTCTGTGGGCGAG
AAGCTGGTGCTGAACTGTACCGCCAGAACCGAGCTGAACGTGGGCATCGACTTCAA
CTGGGAGTACCCAGCAGCAAGCACCAGCACAAGAACTGGTCAACCGGGACCTGA
AAACCCAGAGCGGCAGCGAGATGAAGAAATTCCTGAGCACCTGACCATCGACGGC
GTGACCAGATCTGACCAGGGCCTGTACACATGTGCCGCCAGCTCTGGCCTGATGACC
AAGAAAAACAGCACCTTCGTGCGGGTGCACGAGAAGGACAAGACCCACACCTGTCC
TCCATGTCCTGCTCCAGAACTGCTCGGCGGACCTTCCGTGTTCTGTTTCTCCTCAAAG
CCTAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGAA
TGTGTCCCACGAGGATCCCGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAG
TGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTACAATAGCACCTACAGAGTG

GTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTG
CAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCTCCTATCGAGAAAACCATCTCCAAGGCCA
AGGGCCAGCCTAGGGAACCCAGGTTTACACACTGCCTCCAAGCAGGGACGAGCTG
ACAAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTCAAGGGCTTCTACCCTTCCGATATC
GCCGTGGAATGGGAGAGCAATGGCCAGCCTGAGAACAACACTACAAGACAACCCCTCC
TGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTTCTGTACAGCAAGCTGACAGTGGACAAGA
GCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCAC
AACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGTCTCCTGGATAAGAGCTCGCTGATCAG
CCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCTCCCCCGTGCCTTC
CTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGC
ATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAG
CAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCT
ATGGAAGCTTGAATTCAGCTGACGTGCCTCGGACCGCTAGGAACCCCTAGTGATGG
AGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGG
TCGCCCAGCCCCAGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAG

[0540] Иллюстративная последовательность конструкции rAAV-афлиберцепт (SEQ ID NO: 96)

TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCC
GGGCGTCGGGCGACCTTTGGTTCGCCCAGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGA
GGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCTTTGTTCGACGCGGCCGCACGCGTGAC
ATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCAATTAGTTCATAGCC
CATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGC
CCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAA
TAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGG
CAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTA
AATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGC
AGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGGTCGAGGTGAGCCCCACGTTT
TGCTTCACTCTCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCAATTTTGTATTTATTTATTT
TTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCG
GGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAG
CCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGG
CGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGGCGGGGAGTCGCTGCGTTGCCTTCGCC
CCGTGCCCGCTCCGCGCCGCCTCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGTT
ACTCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCGCTT

GGTTTAATGACGGCTCGTTTCTTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTAAAGGGCTCCG
GGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCGTGTGTGTGTGC
GTGGGGAGCGCCGCGTGCGGCCCGCGCTGCCCGGCGGCTGTGAGCGCTGCGGGCGC
GGCGCGGGGCTTTGTGCGCTCCGCGTGTGCGCGAGGGGAGCGCGGCCGGGGGCGGT
GCCCCGCGGTGCGGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAAGGCTGCGTGCGGGGTGTGTGC
GTGGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGCGGCGGTTCGGGCTGTAACCCCCCCTGC
ACCCCCCTCCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTGCGG
GGCGTGGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGGGGTGGCGGCAGGTGGGGGTGCC
GGGCGGGGCGGGGCCGCTCGGGCCGGGGAGGGCTCGGGGGAGGGGCGCGGCGGC
CCCCGGAGCGCCGGCGGCTGTGAGGCGCGGCGAGCCGCAGCCATTGCCTTTTATG
GTAATCGTGCGAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCCAAATCTGTGCGGAGCCGA
AATCTGGGAGGGCGCCGCCGCACCCCCTCTAGCGGGCGCGGGGGCGAAGCGGTGCGGC
GCCGGCAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTCGCCGCGCCGCGTCC
CCTTCTCCCTCTCCAGCCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGGACGGCTGCCTTCGGGGGGG
ACGGGGCAGGGCGGGGTTTCGGCTTCTGGCGTGTGACCGGCGGCTCTAGAGCCTCTG
CTAACCATGTTTCATGCCTTCTTTTCTTACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTTAT
TGTGACCGGTGCCACCATGTACCGGATGCAGCTGCTGAGCTGTATCGCCCTGTCTCT
GGCCCTGGTCACCAATTCTAGCGATACCGGCAGACCCTTCGTGGAAATGTACAGCG
AGATCCCCGAGATCATCCACATGACCGAGGGCAGAGAGCTGGTCATCCCCTGCAGA
GTGACAAGCCCCAACATCACCGTGACTCTGAAGAAGTTCCCTCTGGACACACTGATC
CCCGACGGCAAGAGAATCATCTGGGACAGCCGGAAGGGCTTCATCATCAGCAACGC
CACCTACAAAGAGATCGGCCTGCTGACCTGTGAAGCCACCGTGAATGGCCACCTGT
ACAAGACCAACTACCTGACACACAGACAGACCAACACCATCATCGACGTGGTGCTG
AGCCCTAGCCACGGCATTGAACTGTCTGTGGGCGAGAAGCTGGTGCTGAACTGTAC
CGCCAGAACCGAGCTGAACGTGGGCATCGACTTCAACTGGGAGTACCCAGCAGCA
AGCACCAGCACAAGAACTGGTCAACCGGGACCTGAAAACCCAGAGCGGCAGCGA
GATGAAGAAATTCCTGAGCACCTGACCATCGACGGCGTGACCAGATCTGACCAGG
GCCTGTACACATGTGCCGCCAGCTCTGGCCTGATGACCAAGAAAAACAGCACCTTC
GTGCGGGTGCACGAGAAGGACAAGACCCACACCTGTCCTCCATGTCCTGCTCCAGA
ACTGCTCGGCGGACCTTCCGTGTTCCCTGTTTCCCTCAAAGCCTAAGGACACCCTGAT
GATCAGCAGAACCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCCACGAGGATC
CCGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACC
AAGCCTAGAGAGGAACAGTACAATAGCACCTACAGAGTGGTGTCCGTGCTGACCGT
GCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGG

CCCTGCCTGCTCCTATCGAGAAAACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAA
CCCCAGGTTTACACACTGCCTCCAAGCAGGGACGAGCTGACAAAGAACCAGGTGTC
CCTGACCTGCCTGGTCAAGGGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAG
CAATGGCCAGCCTGAGAACAACCTACAAGACAACCCCTCCTGTGCTGGACAGCGACG
GCTCATTCTTCTGTACAGCAAGCTGACAGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGC
AACGTGTTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAA
GTCCCTGAGCCTGTCTCCTGGATAAGAGCTCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCT
AGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCCTCCCCCGTGCCTTCTTGACCCTGGAAGGTG
CCTACTCCCCTGTCCTTTCCTAATAAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTA
GGTGTCAATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGG
GAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGAAGCTTGAATTCA
GCTGACGTGCCTCGGACCGCCTAGGAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCC
CTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCCGACGCC
GGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCA
A

Композиции множественных конструкций AAV

[0541] В настоящем раскрытии подразумевается, что некоторые кодирующие последовательности, кодирующие белок (например, анти-VEGF белок), могут быть доставлены путем разделения кодирующей последовательности на несколько частей, каждая из которых включена в отдельную конструкцию. В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложены композиции или системы, включающие по меньшей мере две различные конструкции (например, две, три, четыре, пять или шесть). В некоторых вариантах осуществления каждая из по меньшей мере двух различных конструкций содержит кодирующую последовательность, которая кодирует различную часть кодирующей области (например, кодирующую белок-мишень, например, белок-мишень внутреннего уха, например, анти-VEGF белок), каждая из кодируемых частей содержит по меньшей мере 10 аминокислот (например, по меньшей мере около 10 аминокислот, по меньшей мере около 20 аминокислот, по меньшей мере около 30 аминокислот, по меньшей мере около 60 аминокислот, по меньшей мере около 70 аминокислот, по меньшей мере около 80 аминокислот, по меньшей мере около 90 аминокислот, по меньшей мере около 100 аминокислот, по меньшей мере около 110 аминокислот, по меньшей мере около 120 аминокислот, по меньшей мере около 130 аминокислот, по меньшей мере около 140 аминокислот, по меньшей мере около 150 аминокислот, по меньшей мере около 160 аминокислот, по меньшей мере около 170

перекрываются с аминокислотной последовательностью другой из кодируемых частей; ни одна конструкция из по меньшей мере двух различных конструкций не кодирует активный белок-мишень; и при введении в клетку субъекта (например, клетку животного, например, клетку примата, например, клетку человека), по меньшей мере две различные конструкции могут подвергаться гомологичной рекомбинации друг с другом, при этом рекомбинированная нуклеиновая кислота кодирует активный белок-мишень (например, анти-VEGF белок). В некоторых вариантах осуществления одна из конструкций нуклеиновой кислоты может включать кодирующую последовательность, которая кодирует часть белка-мишени (например, анти-VEGF белок), причем кодируемая часть содержит не более 820 аминокислот (например, не более около 10 аминокислот, не более около 20 аминокислот, не более около 30 аминокислот, не более около 60 аминокислот, не более около 70 аминокислот, не более около 80 аминокислот, не более около 90 аминокислот, не более около 100 аминокислот, не более около 110 аминокислот, не более около 120 аминокислот, не более около 130 аминокислот, не более около 140 аминокислот, не более около 150 аминокислот, не более около 160 аминокислот, не более около 170 аминокислот, не более около 180 аминокислот, не более около 190 аминокислот, не более около 200 аминокислот, не более около 210 аминокислот, не более около 220 аминокислот, не более около 230 аминокислот, не более около 240 аминокислот, не более около 250 аминокислот, не более около 260 аминокислот, не более около 270 аминокислот, не более около 280 аминокислот, не более около 290 аминокислот, не более около 300 аминокислот, не более около 310 аминокислот, не более около 320 аминокислот, не более около 330 аминокислот, не более около 340 аминокислот, не более около 350 аминокислот, не более около 360 аминокислот, не более около 370 аминокислот, не более около 380 аминокислот, не более около 390 аминокислот, не более около 400 аминокислот, не более около 410 аминокислот, не более около 420 аминокислот, не более около 430 аминокислот, не более около 440 аминокислот, не более около 450 аминокислот, не более около 460 аминокислот, не более около 470 аминокислот, не более около 480 аминокислот, не более около 490 аминокислот, не более около 500 аминокислот, не более около 510 аминокислот, не более около 520 аминокислот, не более около 530 аминокислот, не более около 540 аминокислот, не более около 550 аминокислот, не более около 560 аминокислот, не более около 570 аминокислот, не более около 580 аминокислот, не более около 590 аминокислот, не более около 600 аминокислот, не более около 610 аминокислот, не более около 620 аминокислот, не более около 630 аминокислот, не более около 640 аминокислот, не более около 650 аминокислот, не более около 660 аминокислот, не более около 670 аминокислот, не более

около 680 аминокислот, не более около 690 аминокислот, не более около 700 аминокислот, не более около 710 аминокислот, не более около 720 аминокислот, не более около 730 аминокислот, не более около 740 аминокислот, не более около 750 аминокислот, не более около 760 аминокислот, не более около 770 аминокислот, не более около 780 аминокислот, не более около 790 аминокислот, не более около 800 аминокислот, не более около 810 аминокислот или не более около 820 аминокислот).

[0542] В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность кодируемой части каждой из конструкций не перекрывается, даже частично, с аминокислотной последовательностью другой из кодируемых частей. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность кодируемой части конструкции частично перекрывается с аминокислотной последовательностью кодируемой части другой конструкции. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность кодируемой части каждой конструкции частично перекрывается с аминокислотной последовательностью кодируемой части по меньшей мере одной другой конструкции. В некоторых вариантах осуществления перекрывающаяся аминокислотная последовательность имеет длину от около 10 аминокислотных остатков до около 820 аминокислот, или в любом из поддиапазонов этого диапазона (например, около 10 аминокислот, около 20 аминокислот, около 30 аминокислот, около 60 аминокислот, около 70 аминокислот, около 80 аминокислот, около 90 аминокислот, около 100 аминокислот, около 110 аминокислот, около 120 аминокислот, около 130 аминокислот, около 140 аминокислот, около 150 аминокислот, около 160 аминокислот, около 170 аминокислот, около 180 аминокислот, около 190 аминокислот, около 200 аминокислот, около 210 аминокислот, около 220 аминокислот, около 230 аминокислот, около 240 аминокислот, около 250 аминокислот, около 260 аминокислот, около 270 аминокислот, около 280 аминокислот, около 290 аминокислот, около 300 аминокислот, около 310 аминокислот, около 320 аминокислот, около 330 аминокислот, около 340 аминокислот, около 350 аминокислот, около 360 аминокислот, около 370 аминокислот, около 380 аминокислот, около 390 аминокислот, около 400 аминокислот, около 410 аминокислот, около 420 аминокислот, около 430 аминокислот, около 440 аминокислот, около 450 аминокислот, около 460 аминокислот, около 470 аминокислот, около 480 аминокислот, около 490 аминокислот, около 500 аминокислот, около 510 аминокислот, около 520 аминокислот, около 530 аминокислот, около 540 аминокислот, около 550 аминокислот, около 560 аминокислот, около 570 аминокислот, около 580 аминокислот, около 590 аминокислот, около 600 аминокислот, около 610 аминокислот, около 620 аминокислот, около 630

аминокислот, около 640 аминокислот, около 650 аминокислот, около 660 аминокислот, около 670 аминокислот, около 680 аминокислот, около 690 аминокислот, около 700 аминокислот, около 710 аминокислот, около 720 аминокислот, около 730 аминокислот, около 740 аминокислот, около 750 аминокислот, около 760 аминокислот, около 770 аминокислот, около 780 аминокислот, около 790 аминокислот, около 800 аминокислот, около 810 аминокислот или около 820 аминокислот).

[0543] В некоторых примерах желаемый генный продукт (например, терапевтический генный продукт) кодируется по меньшей мере двумя разными конструкциями. В некоторых вариантах осуществления каждая из по меньшей мере двух различных конструкций включает в себя различный сегмент потенциально кодирующей области, при этом кодирующая область может включать или не включать некодирующие последовательности, такие как интроны и/или регуляторные области. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере две различные конструкции транскрибируют одну и ту же клетку. В некоторых вариантах осуществления транскрибированная клетка транскрибирует и транслирует две разные конструкции. В некоторых вариантах осуществления транслированные полипептиды могут затем объединяться на уровне третичной и/или четвертичной структуры с образованием функционального анти-VEGF белка. Например, в некоторых вариантах осуществления легкая цепь ранибизумаба и тяжелая цепь ранибизумаба кодируются по меньшей мере в двух различных конструкциях и после трансляции объединяются с образованием белка ранибизумаба способом, описанным в данном документе и известным в данной области техники.

[0544] В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе композиции, содержащие анти-VEGF ген, включают встречающиеся в природе и/или синтетические интронные последовательности. Интрон может содержать нуклеотидную последовательность интрона, которая присутствует в эндогенной последовательности геномной ДНК (например, геномной ДНК-мишени клеток внутреннего уха (например, последовательность геномной ДНК VEGF и/или VEGF-R). В некоторых вариантах осуществления различные сегменты интрона перекрываются. В некоторых вариантах осуществления различные сегменты интрона перекрываются по последовательности не более чем на 12 000 нуклеотидов (например, не более чем на около 100 нуклеотидов, не более чем на около 200 нуклеотидов, не более чем на около 300 нуклеотидов, не более чем на около 600 нуклеотидов, не более чем на около 700 нуклеотидов, не более чем на около 800 нуклеотидов, не более чем на около 900 нуклеотидов, не более чем на около 1000 нуклеотидов, не более чем на около 1100 нуклеотидов, не более чем на около 1200

нуклеотидов, не более чем на около 8100 нуклеотидов, не более чем на около 8200 нуклеотидов, не более чем на около 8300 нуклеотидов, не более чем на около 8400 нуклеотидов, не более чем на около 8500 нуклеотидов, не более чем на около 8600 нуклеотидов, не более чем на около 8700 нуклеотидов, не более чем на около 8800 нуклеотидов, не более чем на около 8900 нуклеотидов, не более чем на около 9000 нуклеотидов, не более чем на около 9100 нуклеотидов, не более чем на около 9200 нуклеотидов, не более чем на около 9300 нуклеотидов, не более чем на около 9400 нуклеотидов, не более чем на около 9500 нуклеотидов, не более чем на около 9600 нуклеотидов, не более чем на около 9700 нуклеотидов, не более чем на около 9800 нуклеотидов, не более чем на около 9900 нуклеотидов, не более чем на около 10 000 нуклеотидов, не более чем на около 10 100 нуклеотидов, не более чем на около 10 200 нуклеотидов, не более чем на около 10 300 нуклеотидов, не более чем на около 10 400 нуклеотидов, не более чем на около 10 500 нуклеотидов, не более чем на около 10 600 нуклеотидов, не более чем на около 10 700 нуклеотидов, не более чем на около 10 800 нуклеотидов, не более чем на около 10 900 нуклеотидов, не более чем на около 11 000 нуклеотидов, не более чем на около 11 100 нуклеотидов, не более чем на около 11 200 нуклеотидов, не более чем на около 11 300 нуклеотидов, не более чем на около 11 400 нуклеотидов, не более чем на около 11 500 нуклеотидов, не более чем на около 11 600 нуклеотидов, не более чем на около 11 700 нуклеотидов, не более чем на около 11 800 нуклеотидов, не более чем на около 11 900 нуклеотидов или не более чем на около 12 000 нуклеотидов) в длину. В некоторых вариантах осуществления перекрывающаяся нуклеотидная последовательность в любых двух различных конструкциях может включать часть или все из одного или более экзонов гена-мишени (например, анти-VEGF гена).

[0545] В некоторых вариантах осуществления композиция или система представляет собой или включает две, три, четыре или пять различных конструкций. В композициях, в которых количество различных конструкций равно двум, первая из двух различных конструкций может включать кодирующую последовательность, кодирующую N-концевую часть белка (например, анти-VEGF белок), которая может обозначаться как ведущая часть, первая конструкция или 5'-часть (например, одна из по меньшей мере двух цепей антитела, например, последовательность, кодирующая переменную область тяжелой цепи и/или переменную область легкой цепи). В некоторых примерах N-концевая часть гена-мишени имеет длину по меньшей мере около 10 аминокислот (например, по меньшей мере около 10 аминокислот, по меньшей мере около 20 аминокислот, по меньшей мере около 30 аминокислот, по меньшей мере около 60

аминокислот, по меньшей мере около 750 аминокислот, по меньшей мере около 760 аминокислот, по меньшей мере около 770 аминокислот, по меньшей мере около 780 аминокислот, по меньшей мере около 790 аминокислот, по меньшей мере около 800 аминокислот, по меньшей мере около 810 аминокислот или по меньшей мере около 820 аминокислот). В некоторых примерах первая конструкция содержит один или оба из промотора (например, любой из промоторов, описанных в данном документе или известных в данной области техники) и последовательности Козак (например, любую из иллюстративных последовательностей Козак, описанных в данном документе или известных в данной области техники). В некоторых примерах первая конструкция содержит промотор, который является индуцибельным промотором, конститутивным промотором или тканеспецифичным промотором. В некоторых примерах вторая из двух разных конструкций содержит кодирующую последовательность, которая кодирует С-концевую часть белка, которая может называться концевой частью, второй конструкцией или 3'-частью (например, одна из по меньшей мере двух цепей антитела, например, последовательность, кодирующая переменную область тяжелой цепи и/или переменную область легкой цепи).. В некоторых примерах С-концевая часть белка имеет длину по меньшей мере около 10 аминокислот (например, по меньшей мере около 10 аминокислот, по меньшей мере около 20 аминокислот, по меньшей мере около 30 аминокислот, по меньшей мере около 60 аминокислот, по меньшей мере около 70 аминокислот, по меньшей мере около 80 аминокислот, по меньшей мере около 90 аминокислот, по меньшей мере около 100 аминокислот, по меньшей мере около 110 аминокислот, по меньшей мере около 120 аминокислот, по меньшей мере около 130 аминокислот, по меньшей мере около 140 аминокислот, по меньшей мере около 150 аминокислот, по меньшей мере около 160 аминокислот, по меньшей мере около 170 аминокислот, по меньшей мере около 180 аминокислот, по меньшей мере около 190 аминокислот, по меньшей мере около 200 аминокислот, по меньшей мере около 210 аминокислот, по меньшей мере около 220 аминокислот, по меньшей мере около 230 аминокислот, по меньшей мере около 240 аминокислот, по меньшей мере около 250 аминокислот, по меньшей мере около 260 аминокислот, по меньшей мере около 270 аминокислот, по меньшей мере около 280 аминокислот, по меньшей мере около 290 аминокислот, по меньшей мере около 300 аминокислот, по меньшей мере около 310 аминокислот, по меньшей мере около 320 аминокислот, по меньшей мере около 330 аминокислот, по меньшей мере около 340 аминокислот, по меньшей мере около 350 аминокислот, по меньшей мере около 360 аминокислот, по меньшей мере около 370

аминокислот, по меньшей мере около 380 аминокислот, по меньшей мере около 390
аминокислот, по меньшей мере около 400 аминокислот, по меньшей мере около 410
аминокислот, по меньшей мере около 420 аминокислот, по меньшей мере около 430
аминокислот, по меньшей мере около 440 аминокислот, по меньшей мере около 450
аминокислот, по меньшей мере около 460 аминокислот, по меньшей мере около 470
аминокислот, по меньшей мере около 480 аминокислот, по меньшей мере около 490
аминокислот, по меньшей мере около 500 аминокислот, по меньшей мере около 510
аминокислот, по меньшей мере около 520 аминокислот, по меньшей мере около 530
аминокислот, по меньшей мере около 540 аминокислот, по меньшей мере около 550
аминокислот, по меньшей мере около 560 аминокислот, по меньшей мере около 570
аминокислот, по меньшей мере около 580 аминокислот, по меньшей мере около 590
аминокислот, по меньшей мере около 600 аминокислот, по меньшей мере около 610
аминокислот, по меньшей мере около 620 аминокислот, по меньшей мере около 630
аминокислот, по меньшей мере около 640 аминокислот, по меньшей мере около 650
аминокислот, по меньшей мере около 660 аминокислот, по меньшей мере около 670
аминокислот, по меньшей мере около 680 аминокислот, по меньшей мере около 690
аминокислот, по меньшей мере около 700 аминокислот, по меньшей мере около 710
аминокислот, по меньшей мере около 720 аминокислот, по меньшей мере около 730
аминокислот, по меньшей мере около 740 аминокислот, по меньшей мере около 750
аминокислот, по меньшей мере около 760 аминокислот, по меньшей мере около 770
аминокислот, по меньшей мере около 780 аминокислот, по меньшей мере около 790
аминокислот, по меньшей мере около 800 аминокислот, по меньшей мере около 810
аминокислот или по меньшей мере около 820 аминокислот). В некоторых примерах вторая
конструкция дополнительно включает последовательность поли(А).

[0546] В некоторых примерах, когда количество различных конструкций в композиции равно двум, N-концевая часть, кодируемая одной из двух конструкций, может включать часть, включающую от аминокислотного положения 1 до приблизительно аминокислотного положения 820, или любой поддиапазон этого диапазона (например, от аминокислоты 1 до по меньшей мере приблизительно аминокислоты 10, от аминокислоты 1 до по меньшей мере приблизительно аминокислоты 20, от аминокислоты 1 до по меньшей мере приблизительно аминокислоты 30, от аминокислоты 1 до по меньшей мере приблизительно аминокислоты 60, от аминокислоты 1 до по меньшей мере приблизительно аминокислоты 70, от аминокислоты 1 до по меньшей мере приблизительно аминокислоты 80, от аминокислоты 1 до по меньшей мере приблизительно аминокислоты 90, от

приблизительно аминокислоты 780, от аминокислоты 1 до по меньшей мере приблизительно аминокислоты 790, от аминокислоты 1 до по меньшей мере приблизительно аминокислоты 800, от аминокислоты 1 до по меньшей мере приблизительно аминокислоты 810 или от аминокислоты 1 до по меньшей мере приблизительно аминокислоты 820) анти-VEGF белка (например, SEQ ID NO: 16, 17, 18, 20, 21, 23 и/или 43). В некоторых примерах, когда число различных конструкций в композиции равно двум, N-концевая часть предшественника анти-VEGF белка может включать часть, включающую не более чем от аминокислотного положения 1 до аминокислотного положения 820 или любой поддиапазон этого диапазона (например, от аминокислоты 1 до не более чем приблизительно аминокислоты 10, от аминокислоты 1 до не более чем приблизительно аминокислоты 20, от аминокислоты 1 до не более чем приблизительно аминокислоты 30, от аминокислоты 1 до не более чем приблизительно аминокислоты 60, от аминокислоты 1 до не более чем приблизительно аминокислоты 70, от аминокислоты 1 до не более чем приблизительно аминокислоты 80, от аминокислоты 1 до не более чем приблизительно аминокислоты 90, от аминокислоты 1 до не более чем приблизительно аминокислоты 100, от аминокислоты 1 до не более чем приблизительно аминокислоты 110, от аминокислоты 1 до не более чем приблизительно аминокислоты 120, от аминокислоты 1 до не более чем приблизительно аминокислоты 130, от аминокислоты 1 до не более чем приблизительно аминокислоты 140, от аминокислоты 1 до не более чем приблизительно аминокислоты 150, от аминокислоты 1 до не более чем приблизительно аминокислоты 160, от аминокислоты 1 до не более чем приблизительно аминокислоты 170, от аминокислоты 1 до не более чем приблизительно аминокислоты 180, от аминокислоты 1 до не более чем приблизительно аминокислоты 190, от аминокислоты 1 до не более чем приблизительно аминокислоты 200, от аминокислоты 1 до не более чем приблизительно аминокислоты 210, от аминокислоты 1 до не более чем приблизительно аминокислоты 220, от аминокислоты 1 до не более чем приблизительно аминокислоты 230, от аминокислоты 1 до не более чем приблизительно аминокислоты 240, от аминокислоты 1 до не более чем приблизительно аминокислоты 250, от аминокислоты 1 до не более чем приблизительно аминокислоты 260, от аминокислоты 1 до не более чем приблизительно аминокислоты 270, от аминокислоты 1 до не более чем приблизительно аминокислоты 280, от аминокислоты 1 до не более чем приблизительно аминокислоты 290, от аминокислоты 1 до не более чем приблизительно аминокислоты 300, от аминокислоты 1 до не более чем приблизительно аминокислоты 310, от аминокислоты 1 до не более чем приблизительно аминокислоты 320, от аминокислоты 1 до не более чем приблизительно аминокислоты 330, от аминокислоты 1

аминокислоты 760, от аминокислоты 1 до не более чем приблизительно аминокислоты 770, от аминокислоты 1 до не более чем приблизительно аминокислоты 780, от аминокислоты 1 до не более чем приблизительно аминокислоты 790, от аминокислоты 1 до не более чем приблизительно аминокислоты 800, от аминокислоты 1 до не более чем приблизительно аминокислоты 810 или от аминокислоты 1 до не более чем приблизительно аминокислоты 820) анти-VEGF белка (например, SEQ ID NO: 16, 17, 18, 20, 21, 23 и/или 43)

[0547] В некоторых примерах, когда количество различных конструкций в композиции равно двум, С-концевая часть, кодируемая одной из двух конструкций, может включать часть, включающую от конечной аминокислоты (например, приблизительно аминокислотного положения 820) до приблизительно аминокислотного положения 1, или любой поддиапазон этого диапазона (например, от аминокислоты 820 до по меньшей мере приблизительно аминокислоты 10, от аминокислоты 820 до по меньшей мере приблизительно аминокислоты 20, от аминокислоты 820 до по меньшей мере приблизительно аминокислоты 30, от аминокислоты 820 до по меньшей мере приблизительно аминокислоты 60, от аминокислоты 820 до по меньшей мере приблизительно аминокислоты 70, от аминокислоты 820 до по меньшей мере приблизительно аминокислоты 80, от аминокислоты 820 до по меньшей мере приблизительно аминокислоты 90, от аминокислоты 820 до по меньшей мере приблизительно аминокислоты 100, от аминокислоты 820 до по меньшей мере приблизительно аминокислоты 110, от аминокислоты 820 до по меньшей мере приблизительно аминокислоты 120, от аминокислоты 820 до по меньшей мере приблизительно аминокислоты 130, от аминокислоты 820 до по меньшей мере приблизительно аминокислоты 140, от аминокислоты 820 до по меньшей мере приблизительно аминокислоты 150, от аминокислоты 820 до по меньшей мере приблизительно аминокислоты 160, от аминокислоты 820 до по меньшей мере приблизительно аминокислоты 170, от аминокислоты 820 до по меньшей мере приблизительно аминокислоты 180, от аминокислоты 820 до по меньшей мере приблизительно аминокислоты 190, от аминокислоты 820 до по меньшей мере приблизительно аминокислоты 200, от аминокислоты 820 до по меньшей мере приблизительно аминокислоты 210, от аминокислоты 820 до по меньшей мере приблизительно аминокислоты 220, от аминокислоты 820 до по меньшей мере приблизительно аминокислоты 230, от аминокислоты 820 до по меньшей мере приблизительно аминокислоты 240, от аминокислоты 820 до по меньшей мере приблизительно аминокислоты 250, от аминокислоты 820 до по меньшей мере

приблизительно аминокислоты 600, от аминокислоты 820 до по меньшей мере
приблизительно аминокислоты 610, от аминокислоты 820 до по меньшей мере
приблизительно аминокислоты 620, от аминокислоты 820 до по меньшей мере
приблизительно аминокислоты 630, от аминокислоты 820 до по меньшей мере
приблизительно аминокислоты 640, от аминокислоты 820 до по меньшей мере
приблизительно аминокислоты 650, от аминокислоты 820 до по меньшей мере
приблизительно аминокислоты 660, от аминокислоты 820 до по меньшей мере
приблизительно аминокислоты 670, от аминокислоты 820 до по меньшей мере
приблизительно аминокислоты 680, от аминокислоты 820 до по меньшей мере
приблизительно аминокислоты 690, от аминокислоты 820 до по меньшей мере
приблизительно аминокислоты 700, от аминокислоты 820 до по меньшей мере
приблизительно аминокислоты 710, от аминокислоты 820 до по меньшей мере
приблизительно аминокислоты 720, от аминокислоты 820 до по меньшей мере
приблизительно аминокислоты 730, от аминокислоты 820 до по меньшей мере
приблизительно аминокислоты 740, от аминокислоты 820 до по меньшей мере
приблизительно аминокислоты 750, от аминокислоты 820 до по меньшей мере
приблизительно аминокислоты 760, от аминокислоты 820 до по меньшей мере
приблизительно аминокислоты 770, от аминокислоты 820 до по меньшей мере
приблизительно аминокислоты 780, от аминокислоты 820 до по меньшей мере
приблизительно аминокислоты 790, от аминокислоты 820 до по меньшей мере
приблизительно аминокислоты 800, от аминокислоты 820 до по меньшей мере
приблизительно аминокислоты 810 или от аминокислоты 820 до по меньшей мере
приблизительно аминокислоты 820) анти-VEGF белка (например, SEQ ID NO: 16, 17, 18,
20, 21, 23 и/или 43). В некоторых примерах, когда число различных конструкций в
композиции равно двум, С-концевая часть предшественника анти-VEGF белка может
включать часть, включающую от конечной аминокислоты (например, приблизительно
аминокислотное положение 820) до не более чем приблизительно аминокислотного
положения 1, или любой поддиапазон этого диапазона (например, от аминокислоты 820 до
не более чем приблизительно аминокислоты 10, от аминокислоты 820 до не более чем
приблизительно аминокислоты 20, от аминокислоты 820 до не более чем приблизительно
аминокислоты 30, от аминокислоты 820 до не более чем приблизительно аминокислоты 60,
от аминокислоты 820 до не более чем приблизительно аминокислоты 70, от аминокислоты
820 до не более чем приблизительно аминокислоты 80, от аминокислоты 820 до не более
чем приблизительно аминокислоты 90, от аминокислоты 820 до не более чем

820 до не более чем приблизительно аминокислоты 500, от аминокислоты 820 до не более чем приблизительно аминокислоты 510, от аминокислоты 820 до не более чем приблизительно аминокислоты 520, от аминокислоты 820 до не более чем приблизительно аминокислоты 530, от аминокислоты 820 до не более чем приблизительно аминокислоты 540, от аминокислоты 820 до не более чем приблизительно аминокислоты 550, от аминокислоты 820 до не более чем приблизительно аминокислоты 560, от аминокислоты 820 до не более чем приблизительно аминокислоты 570, от аминокислоты 820 до не более чем приблизительно аминокислоты 580, от аминокислоты 820 до не более чем приблизительно аминокислоты 590, от аминокислоты 820 до не более чем приблизительно аминокислоты 600, от аминокислоты 820 до не более чем приблизительно аминокислоты 610, от аминокислоты 820 до не более чем приблизительно аминокислоты 620, от аминокислоты 820 до не более чем приблизительно аминокислоты 630, от аминокислоты 820 до не более чем приблизительно аминокислоты 640, от аминокислоты 820 до не более чем приблизительно аминокислоты 650, от аминокислоты 820 до не более чем приблизительно аминокислоты 660, от аминокислоты 820 до не более чем приблизительно аминокислоты 670, от аминокислоты 820 до не более чем приблизительно аминокислоты 680, от аминокислоты 820 до не более чем приблизительно аминокислоты 690, от аминокислоты 820 до не более чем приблизительно аминокислоты 700, от аминокислоты 820 до не более чем приблизительно аминокислоты 710, от аминокислоты 820 до не более чем приблизительно аминокислоты 720, от аминокислоты 820 до не более чем приблизительно аминокислоты 730, от аминокислоты 820 до не более чем приблизительно аминокислоты 740, от аминокислоты 820 до не более чем приблизительно аминокислоты 750, от аминокислоты 820 до не более чем приблизительно аминокислоты 760, от аминокислоты 820 до не более чем приблизительно аминокислоты 770, от аминокислоты 820 до не более чем приблизительно аминокислоты 780, от аминокислоты 820 до не более чем приблизительно аминокислоты 790, от аминокислоты 820 до не более чем приблизительно аминокислоты 800, от аминокислоты 820 до не более чем приблизительно аминокислоты 810 или от аминокислоты 820 до не более чем приблизительно аминокислоты 820) или последовательность любой длины между этими последовательностями анти-VEGF белка (например, SEQ ID NO: 16, 17, 18, 20, 21, 23 и/или 43).

[0548] В некоторых вариантах осуществления сайты сплайсинга вовлечены в транс-сплайсинг. В некоторых вариантах осуществления сайт сплайс-донора (Trapani et al. *EMBO Mol. Med.* 6(2):194-211, 2014, которая полностью включена в данный документ посредством

ссылки) следует за кодирующей последовательностью в N-концевой конструкции. В С-концевой конструкции сайт сплайс-акцептора может быть субклонирован непосредственно кодирующей последовательностью для второй части анти-VEGF гена. В некоторых вариантах осуществления в кодирующую последовательность может быть внесена молчащая мутация, создающая дополнительный сайт для рестрикционного расщепления.

[0549] В некоторых вариантах осуществления любая из предложенных в данном документе конструкций может быть внесена в композицию, подходящую для введения животному для облегчения симптомов, ассоциированных с отологическим заболеванием, характеризующегося неоваскуляризацией (например, ВШ).

Фармацевтические композиции

[0550] В определенных вариантах осуществления композиция по настоящему изобретению относится к отдельному лекарственному продукту-разбавителю (лекарственному продукту-разбавителю AAV), по составу эквивалентному или близкому к буферному раствору состава гAAV-анти-VEGF. В определенных вариантах осуществления лекарственный продукт-разбавитель производят, подвергают стерильной фильтрации (фильтр с размером пор 0,2 мкм) и асептически разливают в одноразовые флаконы. В определенных вариантах осуществления буферный раствор состава содержит стерильную воду, содержащую 1,5 мМ монофосфата калия, 8,1 мМ двухосновного фосфата натрия, 2,7 мМ хлорида калия, 172 мМ хлорида натрия и 0,001 % полоксамера 188. В определенных вариантах осуществления лекарственный продукт-разбавитель будет использоваться для получения концентраций, необходимых для доз, описанных для применения у представляющего интерес млекопитающего (например, нуждающегося в этом человека).

[0551] Помимо прочего, в настоящем изобретении предложены фармацевтические композиции. В некоторых вариантах осуществления композиции, предложенные в данном документе, подходят для введения животному для облегчения симптомов, ассоциированных с отологическим заболеванием, характеризующегося неоваскуляризацией (например, ВШ).

[0552] В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут содержать, например, полинуклеотид, например, одну или более конструкций, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция может содержать одну или более частиц AAV, например, одну или более конструкций гAAV, инкапсулированных одним или более капсидами серотипа AAV, как описано в данном документе.

[0553] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит один или более фармацевтически или физиологически приемлемых носителей, разбавителей или вспомогательных веществ. Используемый в данном документе термин «фармацевтически приемлемый носитель» включает растворители, дисперсионные среды, покрывающие вещества, антибактериальные агенты, противогрибные агенты и тому подобное, которые совместимы с фармацевтическим введением. Дополнительные активные соединения также могут быть включены в любую из композиций, описанных в данном документе. Такие композиции могут содержать один или более буферов, таких как физиологический раствор с нейтральным буфером, физиологический раствор с фосфатным буфером и т.п.; один или более углеводов, таких как глюкоза, манноза, сахароза и декстран; маннит; один или более белков, полипептидов или аминокислот, таких как глицин; один или более антиоксидантов; один или более хелатирующих агентов, таких как ЭДТА или глутатион; и/или один или более консервантов. В некоторых вариантах осуществления составы находятся в лекарственных формах, таких как растворы для инъекций, гели для инъекций, капсулы с высвобождением лекарственного средства и т.п.

[0554] В некоторых вариантах осуществления композиции по настоящему изобретению составлены для внутривенного введения. В некоторых вариантах осуществления композиции по настоящему изобретению составлены для внутрикохлеарного введения. В некоторых вариантах осуществления терапевтическая композиция составлена таким образом, чтобы она содержала липидную наночастицу, полимерную наночастицу, миникольцевую ДНК и/или ДНК CELiD.

[0555] В некоторых вариантах осуществления терапевтическая композиция составлена таким образом, чтобы она содержала раствор синтетической перилимфы. Например, в некоторых вариантах осуществления раствор синтетической перилимфы включает 20-200 мМ NaCl; 1-5 мМ KCl; 0,1-10 мМ CaCl₂; 1-10 мМ глюкозы; и 2-50 мМ HEPES, с pH в диапазоне от около 6 до около 9. В некоторых вариантах осуществления терапевтическую композицию составляют в соответствующих разведениях в физиологически приемлемом растворе (*например*, искусственной перилимфы, содержащей NaCl, 120 мМ; KCl, 3,5 мМ; CaCl₂, 1,5 мМ; глюкозу, 5,5 мМ; HEPES, 20 мМ, который титруют с помощью NaOH для доведения pH до 7,5 (общая концентрация Na⁺ 130 мМ), как описано в Chen et al., J Controlled Rel. 110:1-19, 2005, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки). В некоторых вариантах осуществления терапевтическая композиция составлена таким образом, чтобы она содержала физиологически приемлемый раствор. Например, в некоторых вариантах осуществления физиологически подходящий раствор

содержит коммерчески доступный 1хФСБ с плюрониловой кислотой F68, приготовленный до конечной концентрации: 8,10 мМ двухосновного фосфата натрия, 1,5 мМ монофосфата калия, 2,7 мМ хлорида калия, 172 мМ хлорида натрия и 0,001% плюрониловой кислоты F68). В некоторых вариантах осуществления применяются альтернативные плюрониловые кислоты. В некоторых вариантах осуществления используются альтернативные концентрации ионов.

[0556] В некоторых вариантах осуществления любая из композиций, описанных в данном документе, может дополнительно включать один или более агентов, которые способствуют проникновению нуклеиновой кислоты или любого из векторов, описанных в данном документе, в клетку млекопитающего (например, липосому или катионный липид). В некоторых вариантах осуществления любая из конструкций, описанных в данном документе, может быть составлена с использованием природных и/или синтетических полимеров. Неограничивающие примеры полимеров, которые могут быть включены в любую из композиций, описанных в данном документе, могут включать, без ограничения, DYNAMIC POLYCONJUGATE® (Arrowhead Research Corp., Пасадена, штат Калифорния), составы из Migus Bio (Мэдисон, штат Висконсин) и Roche Madison (Мэдисон, штат Висконсин), полимерные составы PhaseRX, такие как, без ограничений, SMARTT POLYMER TECHNOLOGY® (PhaseRX, Сиэтл, штат Вашингтон), DMRI/DOPE, полуксамер, адъювант VAXFECTIN® из Vical (Сан-Диего, штат Калифорния), хитозан, циклодекстрин из Calando Pharmaceuticals (Пасадена, штат Калифорния), дендримеры и полимеры (молочно-гликолевой кислоты) (PLGA), полимеры RONDEL™ (РНКи/олигонуклеотидная доставка наночастиц) (Arrowhead Research Corporation, Пасадена, штат Калифорния) и pH-чувствительные сополимерные полимеры, такие как, без ограничения, полимеры, произведенные PhaseRX (Сиэтл, штат Вашингтон). Многие из этих полимеров продемонстрировали эффективность в доставке олигонуклеотидов *in vivo* в клетку млекопитающего (см., например, deFougerolles, Human Gene Ther. 19:125-132, 2008; Rozema et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 104:12982-12887, 2007; Rozema et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 104:12982-12887, 2007; Hu-Lieskovan et al., Cancer Res. 65:8984-8982, 2005; Heidel et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 104:5715-5721, 2007, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки).

[0557] В некоторых вариантах осуществления композиция содержит фармацевтически приемлемый носитель (например, забуференный фосфатом физиологический раствор, солевой раствор или бактериостатическую воду). В некоторых вариантах осуществления после составления раствора могут вводиться способом, совместимым с дозированной

композицией, и в таком количестве, которое является терапевтически эффективным. В некоторых вариантах осуществления составы вводят в виде различных лекарственных форм, таких как растворы для инъекций, гели для инъекций, капсулы с высвобождением лекарственного средства и т.п.

[0558] В некоторых вариантах осуществления композиция, предложенная в данном документе, может быть составлена так, чтобы быть совместимой с предполагаемым путем введения. Неограничивающим примером предполагаемого пути введения является местное введение (например, внутрикохлеарное введение).

[0559] В некоторых вариантах осуществления предложенная композиция содержит одну конструкцию нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления предложенная композиция содержит две или более различных конструкции. В некоторых вариантах осуществления композиция включает одиночную конструкцию нуклеиновой кислоты, содержащую кодирующую последовательность, которая кодирует анти-VEGF белок и/или его функциональную характерную часть. В некоторых вариантах осуществления композиции содержат одиночную конструкцию нуклеиновой кислоты, содержащую кодирующую последовательность, которая кодирует анти-VEGF белок и/или его функциональную характерную часть, при введении которой в клетку млекопитающего эта кодирующая последовательность интегрируется в геном клетки млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления композиция, содержащая по меньшей мере две различные конструкции, например, конструкции включают кодирующие последовательности, которые кодируют различные части анти-VEGF белка, конструкции могут быть объединены для создания последовательности, кодирующей активный анти-VEGF белок (например, полноразмерный белок ранибизумаб, бевацизумаб или афлиберцепт) в клетке млекопитающего, и тем самым обеспечивать лечение ассоциированной ВШ и/или других отологических заболеваний, характеризующихся неоваскуляризацией и поддающихся лечению анти-VEGF белком, как описано в данном документе.

[0560] Также предложены наборы, содержащие любую из композиций, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления набор может содержать твердую композицию (например, лиофилизированную композицию, содержащую по меньшей мере две различные конструкции, описанные в данном документе) и жидкость для сольюбилизации лиофилизированной композиции. В некоторых вариантах осуществления набор может содержать предварительно заполненный шприц, содержащий любую из композиций, описанных в данном документе.

[0561] В некоторых вариантах осуществления набор содержит флакон, содержащий любую из композиций, описанных в данном документе (например, приготовленных в виде водной композиции, например, водной фармацевтической композиции). В некоторых вариантах осуществления набор может содержать инструкции для выполнения любого из способов, описанных в данном документе.

Генетически модифицированные клетки

[0562] В настоящем изобретении также предложена клетка (например, клетка животного, например, клетка млекопитающего, например, клетка примата, например, клетка человека), которая включает любую из нуклеиновых кислот, конструкций или композиций, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления клетка животного представляет собой клетку человека (например, поддерживающую клетку человека или волосковую клетку человека). В других вариантах осуществления клетка животного представляет собой клетку млекопитающего, отличного от человека (например, клетка обезьян, клетка кошачьих, клетка псовых и т. д.). Специалисту в данной области техники будет понятно, что нуклеиновые кислоты и конструкции, описанные в данном документе, могут быть введены в любую клетку животного (например, поддерживающие или волосковые клетки любого животного, подходящего для ветеринарного вмешательства). В данном документе описаны неограничивающие примеры конструкций и способов введения конструкций в клетки млекопитающих.

[0563] В некоторых вариантах осуществления клетка животного может представлять собой любую клетку внутреннего уха, включая волосные и/или поддерживающие клетки. Неограничивающие примеры таких клеток включают: клетки Гензена, клетки Дейтерса, клетки эндолимфатического мешка и протока, переходные клетки в мешочке, маточке и ампуле, внутренние и наружные волосковые клетки, клетки спиральной связки, клетки спирального ганглия, клетки спирального выступа, клетки наружного мешочка, маргинальные клетки, промежуточные клетки, базальные клетки, внутренние столбовые клетки, наружные столбовые клетки, клетки Клавдия, внутренние пограничные клетки, внутренние фаланговые клетки или клетки сосудистой полоски.

[0564] В некоторых вариантах осуществления клетка животного представляет собой специализированную клетку улитки. В некоторых вариантах осуществления клетка животного представляет собой волосковую клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка животного представляет собой внутреннюю волосковую клетку улитки или наружную волосковую клетку улитки. В некоторых вариантах осуществления клетка

животного представляет собой внутреннюю волосковую клетку улитки. В некоторых вариантах осуществления клетка животного представляет собой наружную волосковую клетку улитки.

[0565] В некоторых вариантах осуществления клетка животного находится в условиях *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления клетка животного относится к типу клеток, который эндогенно присутствует у животного, например, у примата и/или человека. В некоторых вариантах осуществления клетка животного представляет собой аутологичную клетку, полученную от животного и культивированную *ex vivo*.

Способы

[0566] Среди прочего, в настоящем изобретении предложены способы лечения субъекта, имеющего отологическое заболевание, связанное с васкуляризацией, например, ВШ. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение композиции, описанной в данном документе, во внутреннее ухо (например, в улитку) субъекта. Например, в данном документе предложены способы, которые в некоторых вариантах осуществления включают введение во внутреннее ухо (например, улитку) субъекта (например, животного, например, млекопитающего, например, примата, например, человека) эффективного количества, например, терапевтически эффективного количества любой описанной в данном документе композиции. В некоторых вариантах осуществления любого способов, раскрытых в данном документе, у субъекта было ранее идентифицировано наличие дефектного гена-мишени в клетке внутреннего уха (например, ген-мишень в поддерживающей и/или слуховой клетке, имеющий мутацию, которая приводит к снижению экспрессии и/или активности белка-мишени поддерживающей и/или слуховой клетки, кодируемого геном, например, мутация в NF2). Некоторые варианты осуществления любого из способов, раскрытых в данном документе, дополнительно включают до стадии внесения или введения определение наличия у субъекта дефектного гена-мишени в клетке внутреннего уха. Некоторые варианты осуществления любого из этих способов, раскрытых в данном документе, могут дополнительно включать обнаружение мутации в гене-мишени клетки внутреннего уха у субъекта. Некоторые варианты осуществления любого из способов, раскрытых в данном документе, могут дополнительно включать идентификацию или диагностирование у субъекта несиндромальной или синдромальной нейросенсорной тугоухости.

[0567] В некоторых вариантах осуществления раскрытый в данном документе способ включает введение раскрытой в данном документе композиции, например, гAAV-анти-

VEGF, для лечения субъекта, например, млекопитающего, например, человека, например, пациента, с ВШ. В некоторых вариантах осуществления композиция, раскрытая в данном документе, доставляется хирургическим путем, например, в улитку.

[0568] В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется прогрессирующая опухоль, например, опухоль, скорость роста которой составляет по меньшей мере 5%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40% или по меньшей мере 50% по результатам последовательных сканирований, например, опухоль, имеющая признаки прогрессирования. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется прогрессирующая опухоль, например, опухоль, скорость роста которой составляет по меньшей мере 5%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40% или по меньшей мере 50% по результатам последующих сканирований, например, опухоль, имеющая признаки прогрессирования.

[0569] В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется стабильная опухоль, например, опухоль, скорость роста которой составляет по меньшей мере 5%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20% или по меньшей мере 30% по результатам последовательных сканирований, например, опухоль, имеющая признаки прогрессирования. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется стабильная опухоль, например опухоль, скорость роста которой составляет менее 5%, менее 10%, менее 20% или менее 30% по результатам последовательных сканирований, например опухоль, не имеющая признаков существенного прогрессирования.

[0570] В некоторых вариантах осуществления изобретения у субъекта нет опухоли с максимальным размером 2 см или более (например, опухоли, которая может прорасти в мостомозжечковый угол и потенциально сдавливать ствол головного мозга). В некоторых вариантах осуществления субъект не подвергается высокому риску потенциально опасных для жизни осложнений, связанных с опухолью, которых можно избежать с помощью применения современного стандартного лечения посредством хирургической резекции и лучевой терапии. В некоторых вариантах осуществления способ, раскрытый в данном документе, дополнительно включает проведение хирургической резекции или лучевой терапии.

[0571] В некоторых вариантах осуществления изобретения у субъекта имеется опухоль с максимальным размером 2 см или более (например, опухоль, которая может прорасти в мостомозжечковый угол и потенциально сдавливать ствол головного мозга). В некоторых вариантах осуществления субъект подвержен высокому риску потенциально опасных для

жизни осложнений, связанных с опухолью, которых можно избежать путем применения способов и композиций, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления способы и композиции, описанные в данном документе, используются в качестве комбинированной терапии с современными стандартными методами лечения, например, в некоторых вариантах осуществления способ, раскрытый в данном документе, дополнительно включает проведение хирургической резекции или лучевой терапии.

[0572] В некоторых вариантах осуществления у субъекта отсутствует глухота глубокой степени на контралатеральное ухо. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет слуховую функцию в контралатеральном ухе. В некоторых вариантах осуществления субъект может поддерживать доступ к важным слуховым областям, таким как восприятие речи и осведомленность об окружающей среде. В некоторых вариантах осуществления субъекту, имеющему NF2, не вводят композицию, раскрытую в данном документе. В некоторых вариантах осуществления безопасность и переносимость композиции, раскрытой в данном документе, можно оценить при односторонней спорадической прогрессирующей ВШ. В некоторых вариантах осуществления любого из раскрытых в данном документе способов у субъекта наблюдается прогрессирующий рост небольших (максимальный размер менее 2 см) и/или односторонних спорадических опухолей. В некоторых вариантах осуществления безопасность и переносимость композиции, раскрытой в данном документе, например, гAAV-анти-VEGF, можно оценить у субъекта, раскрытого в данном документе.

[0573] В некоторых вариантах осуществления композиция, раскрытая в данном документе, например, гAAV-анти-VEGF, составлена в виде стерильной суспензии для внутрикохлеарного введения. В некоторых вариантах композиция содержит конструкции в количестве по меньшей мере 1×10^{11} , по меньшей мере 5×10^{11} , по меньшей мере 1×10^{12} , по меньшей мере 1×10^{12} , по меньшей мере 2×10^{12} , по меньшей мере 3×10^{12} , по меньшей мере 4×10^{12} , по меньшей мере 5×10^{12} , по меньшей мере 6×10^{12} , по меньшей мере 7×10^{12} , по меньшей мере 8×10^{12} , по меньшей мере 9×10^{12} , по меньшей мере 1×10^{13} , по меньшей мере 2×10^{13} , по меньшей мере 3×10^{13} , по меньшей мере 4×10^{13} , по меньшей мере 5×10^{13} , по меньшей мере 6×10^{13} , по меньшей мере 7×10^{13} , по меньшей мере 8×10^{13} , по меньшей мере 9×10^{13} или по меньшей мере 1×10^{14} векторных геномов (вг) на миллилитр (мл) (вг/мл). В некоторых вариантах композиция содержит конструкции в количестве не более 1×10^{15} , не более 5×10^{14} , не более 1×10^{14} , не более 5×10^{13} , не более 1×10^{13} , не более 9×10^{12} , не более 8×10^{12} , не более 7×10^{12} , не более 6×10^{12} , не более 5×10^{12} , не более 4×10^{12} , не более 3×10^{12} , не более 2×10^{12} или не более 1×10^{12} векторных геномов (вг) на миллилитр

(мл) (вг/мл). В некоторых вариантах осуществления композиция включает конструкции в количестве от около 1×10^{12} вг/мл до 1×10^{13} вг/мл, от около 5×10^{12} вг/мл до 5×10^{13} вг/мл или от около 1×10^{13} вг/мл до около 2×10^{13} вг/мл.

[0574] В некоторых вариантах осуществления композиция включает конструкции в количестве около 1×10^{12} вг/мл, около $1,1 \times 10^{12}$ вг/мл, $1,2 \times 10^{12}$ вг/мл, около $1,3 \times 10^{12}$ вг/мл, около $1,4 \times 10^{12}$ вг/мл, около $1,5 \times 10^{12}$ вг/мл, около $1,6 \times 10^{12}$ вг/мл, около $1,7 \times 10^{12}$ вг/мл, около $1,8 \times 10^{12}$ вг/мл, около $1,9 \times 10^{12}$ вг/мл, около $2,0 \times 10^{12}$ вг/мл, около $2,1 \times 10^{12}$ вг/мл, около $2,2 \times 10^{12}$ вг/мл, около $2,3 \times 10^{12}$ вг/мл, около $2,4 \times 10^{12}$ вг/мл, около $2,5 \times 10^{12}$ вг/мл, около $2,6 \times 10^{12}$ вг/мл, около $2,7 \times 10^{12}$ вг/мл, около $2,8 \times 10^{12}$ вг/мл, около $2,9 \times 10^{12}$ вг/мл, около $3,0 \times 10^{12}$ вг/мл, около $3,1 \times 10^{12}$ вг/мл, около $3,2 \times 10^{12}$ вг/мл, около $3,3 \times 10^{12}$ вг/мл, около $3,4 \times 10^{12}$ вг/мл, около $3,5 \times 10^{12}$ вг/мл, около $3,6 \times 10^{12}$ вг/мл, около $3,7 \times 10^{12}$ вг/мл, около $3,8 \times 10^{12}$ вг/мл, около $3,9 \times 10^{12}$ вг/мл, около $4,0 \times 10^{12}$ вг/мл, около $4,1 \times 10^{12}$ вг/мл, около $4,2 \times 10^{12}$ вг/мл, около $4,3 \times 10^{12}$ вг/мл, около $4,4 \times 10^{12}$ вг/мл, около $4,5 \times 10^{12}$ вг/мл, около $4,6 \times 10^{12}$ вг/мл, около $4,7 \times 10^{12}$ вг/мл, около $4,8 \times 10^{12}$ вг/мл, около $4,9 \times 10^{12}$ вг/мл, около $5,0 \times 10^{12}$ вг/мл, около $5,1 \times 10^{12}$ вг/мл, около $5,2 \times 10^{12}$ вг/мл, около $5,3 \times 10^{12}$ вг/мл, около $5,4 \times 10^{12}$ вг/мл, около $5,5 \times 10^{12}$ вг/мл, около $5,6 \times 10^{12}$ вг/мл, около $5,7 \times 10^{12}$ вг/мл, около $5,8 \times 10^{12}$ вг/мл, около $5,9 \times 10^{12}$ вг/мл, около $6,0 \times 10^{12}$ вг/мл, около $7,0 \times 10^{12}$ вг/мл, около $8,0 \times 10^{12}$ вг/мл, около $9,0 \times 10^{12}$ вг/мл, около $9,1 \times 10^{12}$ вг/мл, около $9,2 \times 10^{12}$ вг/мл, около $9,3 \times 10^{12}$ вг/мл, около $9,4 \times 10^{12}$ вг/мл, около $9,5 \times 10^{12}$ вг/мл, около $9,6 \times 10^{12}$ вг/мл, около $9,7 \times 10^{12}$ вг/мл, около $9,8 \times 10^{12}$ вг/мл, около $9,9 \times 10^{12}$ вг/мл, около 1×10^{13} вг/мл, $1,1 \times 10^{13}$ вг/мл, $1,2 \times 10^{13}$ вг/мл, $1,3 \times 10^{13}$ вг/мл, $1,4 \times 10^{13}$ вг/мл, $1,5 \times 10^{13}$ вг/мл, $1,6 \times 10^{13}$ вг/мл, $1,7 \times 10^{13}$ вг/мл, $1,8 \times 10^{13}$ вг/мл, $1,9 \times 10^{13}$ вг/мл, 2×10^{13} вг/мл, 5×10^{13} вг/мл или 1×10^{14} вг/мл.

[0575] В некоторых вариантах осуществления композиция содержит конструкции в количестве $2,5 \times 10^{12}$ вг/мл +/- 10%.

[0576] В некоторых вариантах осуществления композиция содержит конструкции в количестве 5×10^{12} вг/мл +/- 10%.

[0577] В некоторых вариантах осуществления композиция содержит конструкции в количестве 1×10^{13} вг/мл +/- 10%.

[0578] В некоторых вариантах осуществления композиция, раскрытая в данном документе, гAAV-анти-VEGF, вводится в хирургическом отделении в контролируемых асептических условиях сертифицированным хирургом, имеющим опыт проведения отоларингологических операций. В некоторых вариантах осуществления процедура введения

представляет собой трансканальную диагностическую тимпанотомию с помощью микроскопа или эндоскопа и лазерную микростапедотомию, за которыми следует инъекция через круглое окно для доставки, например, около 0,09 мл раствора, содержащего композицию, описанную в данном документе, например, частицы rAAV-анти-VEGF. Трансканальная диагностическая тимпанотомия представляет собой стандартную процедуру, применяемую для обнажения структур среднего уха; трансканальная диагностическая тимпанотомия часто сопровождается лазерной стапедэктомией (удалением основания стремени) или стапедотомией (созданием отверстия в основании стремени), например, у пациентов с отосклерозом. В некоторых вариантах осуществления отверстие диаметром примерно 0,25 мм в основании стремени (сформированное с помощью отологического лазера) служит для предотвращения потенциально вредного повышения внутрилабиринтного давления.

[0579] В некоторых вариантах осуществления в данном документе раскрыто стерильное одноразовое средство доставки для введения раскрытой в данном документе композиции в перилимфу внутреннего уха через мембрану круглого окна с отверстием, расположенным в основании стремени. В некоторых вариантах осуществления это индивидуальное устройство имеет преимущества по сравнению с доступными материалами, например, как в отношении потенциальной безопасности, так и эффективности терапевтического агента, поскольку оно было специально разработано для внутрикохлеарного пути введения. В некоторых вариантах осуществления элементы конструкции устройства доставки включают: обеспечение стерильности вводимой жидкости; минимизацию попадания пузырьков воздуха во внутреннее ухо; возможность точной подачи небольших объемов с регулируемой скоростью потока (в сочетании с использованием стандартного насоса); возможность визуализации мембраны круглого окна и доставки хирургом через наружный слуховой проход; минимизацию повреждения мембраны круглого окна или улитковых структур за пределами мембраны круглого окна; и/или минимизацию обратного оттока через мембрану круглого окна.

[0580] В некоторых вариантах осуществления любой из способов, раскрытых в данном документе, включает исследование с повышением дозы для оценки безопасности и переносимости у субъектов, например, у млекопитающих, например, у людей, например, у пациентов, например, с односторонней прогрессирующей спорадической ВШ. В некоторых вариантах осуществления раскрытую в данном документе композицию, например, rAAV-анти-VEGF, вводят согласно схеме дозирования, раскрытой в данном документе. В некоторых вариантах осуществления схема дозирования включает либо одностороннее,

либо двустороннее внутрикхлеарное введение дозы, например, как описано в данном документе, композиции, раскрытой в данном документе, например, консервативные замены гAAV-анти-VEGF. В некоторых вариантах осуществления схема дозирования включает доставку в объеме не менее 0,01 мл, не менее 0,02 мл, не менее 0,03 мл, не менее 0,04 мл, не менее 0,05 мл, не менее 0,06 мл, не менее 0,07 мл, не менее 0,08 мл, не менее 0,09 мл, не менее 0,10 мл, не менее 0,11 мл, не менее 0,12 мл, не менее 0,13 мл, не менее 0,14 мл, не менее 0,15 мл, не менее 0,16 мл, не менее 0,17 мл, не менее 0,18 мл, не менее 0,19 мл или не менее 0,20 мл на улитку. В некоторых вариантах осуществления схема дозирования включает доставку в объеме не более 0,30 мл, не более 0,25 мл, не более 0,20 мл, не более 0,15 мл, не более 0,14 мл, не более 0,13 мл, не более 0,12 мл, не более 0,11 мл, не более 0,10 мл, не более 0,09 мл, не более 0,08 мл, не более 0,07 мл, не более 0,06 мл или не более 0,05 мл на улитку. В некоторых вариантах осуществления схема дозирования включает доставку в объеме около 0,05 мл, около 0,06 мл, около 0,07 мл, около 0,08 мл, около 0,09 мл, около 0,10 мл, около 0,11 мл, около 0,12 мл, около 0,13 мл, около 0,14 мл или около 0,15 мл на улитку, например, в зависимости от популяции.

[0581] В некоторых вариантах осуществления схема дозирования включает доставку в объеме от около 0,01 мл до около 0,30 мл, от около 0,01 мл до около 0,25 мл, от около 0,01 мл до около 0,20 мл, от около 0,01 мл до около 0,15 мл, от около 0,01 мл до около 0,14 мл, от около 0,01 мл до около 0,13 мл, от около 0,01 мл до около 0,12 мл, от около 0,01 мл до около 0,11 мл, от около 0,01 мл до около 0,10 мл, от около 0,01 мл до около 0,09 мл, от около 0,01 мл до около 0,08 мл, от около 0,01 мл до около 0,07 мл, от около 0,01 мл до около 0,06 мл, от около 0,01 мл до около 0,05 мл, от около 0,01 мл до около 0,04 мл, от около 0,01 мл до около 0,03 мл или от около 0,01 мл до около 0,02 мл.

[0582] В некоторых вариантах осуществления схема дозирования включает доставку в объеме от около 0,02 мл до около 0,30 мл, от 0,03 мл до около 0,30 мл, от 0,04 мл до около 0,30 мл, от 0,05 мл до около 0,30 мл, от 0,06 мл до около 0,30 мл, от 0,07 мл до около 0,30 мл, от 0,08 мл до около 0,30 мл, от 0,09 мл до около 0,30 мл, от 0,10 мл до около 0,30 мл, от 0,11 мл до около 0,30 мл, от 0,12 мл до около 0,30 мл, от 0,13 мл до около 0,30 мл, от 0,14 мл до около 0,30 мл, от 0,15 мл до около 0,30 мл, от 0,16 мл до около 0,30 мл, от 0,17 мл до около 0,30 мл, от 0,18 мл до около 0,30 мл, от 0,19 мл до около 0,30 мл, от 0,20 мл до около 0,30 мл или от 0,25 мл до около 0,30 мл.

[0583] В некоторых вариантах осуществления схема дозирования включает доставку в объеме от около 0,01 мл до около 0,03 мл, от около 0,02 мл до около 0,25 мл, от около 0,03 мл до около 0,20 мл, от около 0,04 мл до около 0,18 мл, от около 0,05 мл до около 0,16 мл,

от около 0,06 мл до около 0,14 мл, от около 0,07 мл до около 0,12 мл или от около 0,08 мл до около 0,1 мл.

[0584] В некоторых вариантах осуществления субъект со спорадической прогрессирующей ВШ обычно имеет одностороннее заболевание. В некоторых вариантах осуществления субъекту, имеющему одностороннюю спорадическую прогрессирующую ВШ, осуществляют одностороннее введение композиции, описанной в данном документе. В некоторых вариантах осуществления у субъекта с NF2 обычно возникают ВШ с обеих сторон. В некоторых вариантах осуществления субъекту, имеющему NF2, осуществляют либо одностороннее, либо двустороннее введение композиции, раскрытой в данном документе.

[0585] В некоторых вариантах осуществления способ, раскрытый в данном документе, позволяет оценить безопасность и переносимость возрастающих доз композиции, раскрытой в данном документе, например, rAAV-анти-VEGF, вводимой посредством внутрикостной инъекции субъекту, например, в возрасте от 18 до 80 лет, с односторонней спорадической прогрессирующей ВШ. В некоторых вариантах осуществления раскрытая в данном документе композиция, например, rAAV-анти-VEGF, ингибирует рост опухоли.

[0586] В некоторых вариантах осуществления любой из способов, раскрытых в данном документе, включает оценку безопасности и переносимости композиции, раскрытой в данном документе, например, rAAV-анти-VEGF. В некоторых вариантах осуществления оценка эффективности раскрытой в данном документе композиции, например, rAAV-анти-VEGF для лечения спорадической прогрессирующей ВШ, проводится в рандомизированных, контролируемых условиях (с использованием параллельной, неинтервенционной группы наблюдения).

[0587] В некоторых вариантах осуществления, любой из раскрытых в данном документе способов включает определение оптимальной дозы раскрытой в данном документе композиции, например, rAAV-анти-VEGF. В некоторых вариантах осуществления, любой из раскрытых в данном документе способов включает оценку эффективности раскрытой в данном документе композиции, например, rAAV-анти-VEGF в более широкой популяции пациентов с ВШ. В некоторых вариантах осуществления любой из раскрытых в данном документе способов включает определение оптимальной схемы дозирования, например, в том числе при двусторонних опухолях ВШ (на фоне NF2).

[0588] В некоторых вариантах осуществления любого из раскрытых в данном

документе способов, способ дополнительно включает применение современного стандарта лечения, например, хирургической резекции опухоли и/или лучевой терапии.

[0589] В некоторых вариантах осуществления любого из способов, раскрытых в данном документе, ранее имеющиеся нейтрализующие антитела (NAb), обнаруживаемые в сыворотке крови, не оказывают существенного влияния на трансдукцию частиц гAAV, доставляемых посредством внутрикохлеарного способа введения. В некоторых вариантах осуществления субъект, которому вводят композицию, раскрытую в данном документе, имеет ранее имевшиеся нейтрализующие антитела (NAb), например, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления субъект, которому вводят композицию, раскрытую в данном документе, не имеет ранее имевшихся нейтрализующих антител (NAb), например, как описано в данном документе.

[0590] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложены способы облегчения и/или лечения заболевания, характеризующегося неоваскуляризацией (например, ВШ), путем экспрессии анти-VEGF белка (например, белка ранибизумаба, бевацизумаба и/или афлиберцепта) во внутреннем ухе субъекта, например, животного, например, млекопитающего, например, примата, например, человека. В некоторых вариантах осуществления способы включают введение во внутреннее ухо субъекта эффективного количества, например, терапевтически эффективного количества любой из описанных в данном документе композиций, при этом введение облегчает и/или лечит заболевание, характеризующееся неоваскуляризацией, путем экспрессии анти-VEGF белка. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень внутреннего уха, которая продуцирует анти-VEGF белок, может представлять собой сенсорную клетку, например, волосковую клетку, и/или несенсорную клетку, например, поддерживающую клетку, и/или все или любую субпопуляцию клеток внутреннего уха.

[0591] В данном документе также предложены способы повышения уровня экспрессии анти-VEGF белка в любой субпопуляции клеток внутреннего уха субъекта (например, животного, например, млекопитающего, например, примата, например, человека), которые включают: введение во внутреннее ухо субъекта эффективного количества, например, терапевтически эффективного количества любой из композиций, описанных в данном документе, причем введение приводит к повышению уровня экспрессии анти-VEGF белка уха (например, ранибизумаба, бевацизумаба и/или афлиберцепта) в любой субпопуляции клеток внутреннего уха субъекта. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень внутреннего уха может представлять собой сенсорную клетку, например, волосковую клетку, и/или несенсорную клетку, например, поддерживающую клетку, и/или все или

любую субпопуляцию клеток внутреннего уха.

[0592] Также в данном документе предложены способы лечения симптомов, ассоциированных с ВШ (например, потери слуха, шума в ушах, головокружения, ощущения наполненности в ухе, онемения лица, парестезии лица, головной боли, неуклюжей походки, и/или спутанности сознания и т.д.) у субъекта (например, животного, например, субъекта, например, млекопитающего, например, примата, например, человека), у которого выявлено отологическое заболевание, характеризующееся неоваскуляризацией, включающие: введение во внутреннее ухо субъекта эффективного количества, например, терапевтически эффективного количества любой из композиций, описанных в данном документе. Также в данном документе предложены способы, включающие введение во внутреннее ухо субъекта эффективного количества, например, терапевтически эффективного количества любой из композиций, описанных в данном документе.

[0593] Также в данном документе предложены хирургические способы лечения ВШ. В некоторых вариантах осуществления способы включают следующие этапы: осуществление в улитке субъекта разреза, например, первого разреза в первом месте разреза; и внутрикохлеарное введение эффективного количества, например, терапевтически эффективного количества любой из представленных в данном документе композиций. В некоторых вариантах осуществления композицию вводят субъекту в месте разреза, например, в первом месте разреза. В некоторых вариантах осуществления композицию вводят субъекту в первый разрез или через него.

[0594] В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, любую из композиций, описанных в данном документе, вводят субъекту в мембрану овального окна улитки или через нее. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, любую из композиций, описанных в данном документе, вводят субъекту в мембрану круглого окна улитки или через нее. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, композицию вводят с использованием медицинского устройства, способного создавать множество разрезов в мембране круглого окна. В некоторых вариантах осуществления медицинское устройство содержит множество микроигл. В некоторых вариантах осуществления медицинское устройство содержит множество микроигл, включающих, как правило, первый круговой аспект, где каждая микроигла имеет диаметр, по меньшей мере, около 10 мкм. В некоторых вариантах осуществления медицинское устройство содержит основание и/или резервуар, способный удерживать композицию. В некоторых вариантах осуществления медицинское устройство содержит множество полых микроигл,

индивидуально содержащих просвет, через который возможно переносить композицию. В некоторых вариантах осуществления медицинское устройство содержит средство для создания, по меньшей мере, частичного вакуума.

[0595] В некоторых вариантах осуществления технологии по настоящему изобретению используются для лечения субъектов с потерей слуха или с риском потери слуха. В некоторых вариантах осуществления технологии по настоящему изобретению используются для лечения субъектов с потерей слуха или с риском шума в ушах. В некоторых вариантах осуществления технологии по настоящему изобретению используются для лечения субъектов с потерей слуха или с риском вертиго. В некоторых вариантах осуществления технологии по настоящему изобретению используются для лечения субъектов с потерей слуха или с риском роста опухоли ВШ. В некоторых вариантах осуществления технологии по настоящему изобретению используются для лечения субъектов с многочисленными симптомами, ассоциированными с ВШ или риском их возникновения, и/или стандартных вариантов лечения ВШ. Например, в некоторых вариантах осуществления субъект имеет симптомы, связанные по меньшей мере с одним патогенным вариантом NF2. Специалистам в данной области техники будет понятно, что многие различные мутации в NF2 могут привести к возникновению патогенного варианта. В некоторых таких вариантах осуществления патогенный вариант вызывает или может вызвать потерю слуха, шум в ушах, головокружение, рост опухоли и т.д. путем увеличения вероятности развития заболевания, характеризующегося неоваскуляризацией.

[0596] В некоторых вариантах осуществления субъект, испытывающий симптомы, ассоциированные с ВШ (например, потеря слуха, шум в ушах, головокружение, ощущение наполненности в ухе, онемение лица, паралич лица, головные боли, неуклюжая походка, и/или спутанность сознания и т.д.), будет подвергнут обследованию для определения наличия и местонахождения одной или более мутации, которые могут вызывать указанные симптомы, ассоциированные с ВШ. В некоторых таких вариантах осуществления будет оцениваться статус определенных генных продуктов или функции (например, с помощью анализа белка или секвенирования). В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, субъект или животное представляет собой млекопитающее, в некоторых вариантах осуществления млекопитающее представляет собой домашнее животное, сельскохозяйственное животное, животное из зоопарка, примата, отличного от человека, или человека. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, животное, субъект или млекопитающее представляет собой взрослого, подростка, молодого человека, ребенка,

малыша, младенца или новорожденного. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, животное, субъект или млекопитающее имеет возраст 1-5, 1-10, 1-20, 1-30, 1-40, 1-50, 1-60, 1-70, 1-80, 1-90, 1-100, 1-110, 2-5, 2-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90, 90-100, 100-110, 10-30, 10-40, 10-50, 10-60, 10-70, 10-80, 10-90, 10-100, 10-110, 20-40, 20-50, 20-60, 20-70, 20-80, 20-90, 20-100, 20-110, 30-50, 30-60, 30-70, 30-80, 30-90, 30-100, 40-60, 40-70, 40-80, 40-90, 40-100, 50-70, 50-80, 50-90, 50-100, 60-80, 60-90, 60-100, 70-90, 70-100, 70-110, 80-100, 80-110 или 90-110 лет. В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в данном документе способов возраст субъекта или млекопитающего составляет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или 11 месяцев.

[0597] В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе способов и/или композиций может привести к улучшению(ям) симптомов, связанных с ВШ (например, потеря слуха, шум в ушах, головокружение, ощущение наполненности в ухе, онемение лица, парестезия лица, головные боли, неуклюжая походка и/или спутанность сознания и т.д.). В некоторых вариантах осуществления такой симптом измеряется и определяется (например, с использованием любого из показателей для определения улучшения такого симптома, как описано в данном документе или известно в данной области техники) у нуждающегося в этом субъекта в течение по меньшей мере 10 дней, по меньшей мере 15 дней, по меньшей мере 20 дней, по меньшей мере 25 дней, по меньшей мере 30 дней, по меньшей мере 35 дней, по меньшей мере 40 дней, по меньшей мере 45 дней, по меньшей мере 50 дней, по меньшей мере 55 дней, по меньшей мере 60 дней, по меньшей мере 65 дней, по меньшей мере 70 дней, по меньшей мере 75 дней, по меньшей мере 80 дней, по меньшей мере 85 дней, по меньшей мере 100 дней, по меньшей мере 105 дней, по меньшей мере 110 дней, по меньшей мере 115 дней, по меньшей мере 120 дней, по меньшей мере 5 месяцев, по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере 7 месяцев, по меньшей мере 8 месяцев, по меньшей мере 9 месяцев, по меньшей мере 10 месяцев, по меньшей мере 11 месяцев или по меньшей мере 12 месяцев.

[0598] В некоторых вариантах осуществления субъект (например, животное, например, млекопитающее, например, человек) имеет или подвержен риску развития симптомов, ассоциированных с ВШ. (например, потеря слуха, шум в ушах, головокружение, ощущение наполненности в ухе, онемение лица, парестезия лица, головные боли, неуклюжая походка и/или спутанность сознания и т.д.). В некоторых вариантах осуществления у субъекта (например, животного, например, млекопитающего, например, человека) ранее была выявлена мутация в гене NF2. В некоторых вариантах осуществления субъект (например, животное, например, млекопитающее, например, человек) имеет любую из мутаций в гене

NF2, которые, как известно из уровня техники, ассоциируются с заболеванием, характеризующимся неоваскуляризацией, например, ВШ. В некоторых таких вариантах осуществления субъект (например, животное, например, млекопитающее, например, человек) был идентифицирован как носитель мутации в гене, ассоциированном с ВШ (например, с помощью генетического тестирования), которая ранее не была идентифицирована. В некоторых таких вариантах осуществления идентифицированные мутации могут быть новыми (например, ранее не описанными в литературе), и способы лечения субъекта, страдающего или предрасположенного к ВШ, будут персонализированы в соответствии с мутацией (мутациями) конкретного пациента.

[0599] В некоторых вариантах осуществления субъект (например, животное, например, млекопитающее, например, человек) был идентифицирован как носитель мутации в гене NF2 (например, с помощью генетического тестирования). В некоторых вариантах осуществления у субъекта (например, животного, например, млекопитающего, например, человека) выявлена мутация в гене NF2 и диагностированы симптомы, ассоциированные с ВШ (например, потеря слуха, шум в ушах, головокружение, ощущение наполненности в ухе, онемение лица, парестезия лица, головные боли, неуклюжая походка и/или спутанность сознания и т.д.). В некоторых вариантах осуществления у субъекта (например, животного, например, млекопитающего, например, человека) выявлены симптомы, ассоциированные с заболеванием, характеризующимся неоваскуляризацией.

[0600] В некоторых вариантах осуществления успешное лечение ВШ и симптомов, ассоциированных с ВШ (например, потеря слуха, шум в ушах, головокружение, ощущение наполненности в ухе, онемение лица, парестезия лица, головные боли, неуклюжая походка, и/или спутанность сознания и т.д.), может быть определено у субъекта с помощью любого из традиционных способов, известных в данной области, включая, но не ограничиваясь ими: проверку слуха, тесты на шум в ушах, проверку походки, когнитивные тесты, визуализационные методы и/или отбор проб для определения диагностических биомаркеров. Например, неограничивающимися примерами функциональных тестов слуха являются различные типы аудиометрических анализов (например, тестирование чистого тона, тестирование речи, тест среднего уха, акустические стволые вызванные потенциалы и отоакустическая эмиссия).

[0601] В некоторых вариантах осуществления любого предложенного в данном документе способа две или более доз любой композиции, описанной в данном документе, вносят или вводят в улитку субъекта. Некоторые варианты осуществления любого из этих способов могут включать введение или внесение первой дозы композиции в улитку

субъекта, оценку зрительной функции субъекта после введения или введения первой дозы, и введение дополнительной дозы композиции в улитку субъекта, у которого обнаружено отсутствие функции слуха в пределах нормального диапазона (например, определенную с использованием любого слухового теста, известного в данной области техники).

[0602] В некоторых вариантах осуществления любого способа, описанного в данном документе, композиция может быть составлена для интракохлеарного введения. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, описанные в данном документе композиции можно вводить посредством интракохлеарного введения или местного введения. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в данном документе, композиции вводят с использованием медицинского устройства (например, любого из типичных медицинских устройств, описанных в данном документе).

[0603] В некоторых вариантах осуществления интракохлеарное введение может быть выполнено с использованием любого из способов, описанных в данном документе или известных в данной области техники. Например, в некоторых вариантах осуществления композиция может быть введена или внесена в улитку с использованием следующей хирургической техники: сначала с использованием визуализации с помощью жесткого эндоскопа 2,5 мм с углом обзора 0 градусов, внешний слуховой канал очищается и круглый нож используется для четкого очертания барабанной перепонки диаметром около 5 мм. Барабанную перепонку поднимают, и осуществляют введение в среднее ухо сзади. Нервы барабанной перепонки идентифицируют и разделяют, а для удаления скутальной кости используют кюретку, обнажая мембрану круглого окна. Для улучшения апикального распределения введенной или внесенной композиции может быть использован хирургический лазер для небольшой 2-мм фенестрации в овальном окне, чтобы обеспечить смещение перилимфы во время инфузии мембраны через круглое окно композиции. Затем загружают микроинфузионное устройство и доставляют в операционное поле. Устройство направляют к круглому окну, и наконечник помещают внутри костного круглого окна, чтобы обеспечить проникновение микроигл(-ы) в мембрану. Задействуют ножную педаль для обеспечения измеримой, устойчивой инфузии композиции. Затем устройство извлекают, а круглое окно и стремечко заклеивают гель-пенной.

[0604] В некоторых вариантах осуществления любого предложенного в данном документе способа субъект имеет ВШ и/или ассоциированные с ВШ симптомы, или подвержен риску их развития. В некоторых вариантах осуществления любого предложенного в данном документе способа у субъекта ранее была идентифицирована

мутация в гене, вовлеченном в развитие ВШ, такой ген может экспрессироваться в поддерживающих клетках и/или волосковых клетках.

[0605] В некоторых вариантах осуществления клетка субъекта находится в условиях *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления указанную клетку изначально получают от субъекта и культивируют *ex vivo*. В некоторых вариантах осуществления клетка субъекта считается в остальном здоровой, и ее культивируют и размножают *ex vivo*. В некоторых вариантах осуществления ранее было определено, что клетка субъекта имеет дефектный ген-мишень клетки внутреннего уха. В некоторых вариантах осуществления ранее было определено, что клетка субъекта имеет дефектный ген-мишень волосковой клетки. В некоторых вариантах осуществления ранее было определено, что клетка субъекта имеет дефектный ген-мишень поддерживающей клетки.

Устройства, введение и хирургические способы

[0606] В данном документе предложены терапевтические системы доставки для лечения тугоухости (например, несиндромальной нейросенсорной тугоухости или синдромальной нейросенсорной тугоухости). В некоторых вариантах осуществления терапевтическая система доставки включает: i) медицинское устройство, способное создавать один или множество разрезов на мембране круглого окна внутреннего уха нуждающегося в этом субъекта, и ii) эффективную дозу композиции (например, любую из композиций, описанных в данном документе). В некоторых вариантах осуществления медицинское устройство содержит множество микроигл.

[0607] В некоторых вариантах осуществления любого из способов, раскрытых в данном документе, субъект будет получать лечение, включающее введение дозы композиции, раскрытой в данном документе, например, гAAV-анти-VEGF. В некоторых вариантах осуществления субъект может получить по меньшей мере одно дополнительное лечение, включающее введение композиции, раскрытой в данном документе. В некоторых вариантах осуществления субъект будет находиться под наблюдением в течение по меньшей мере 30 дней в промежутке между введением каждой композиции исследуемого препарата (например, раствора, содержащего частицы гAAV).

[0608] В некоторых вариантах осуществления способы и композиции, описанные в данном документе, используются в качестве комбинированной терапии с некоторыми современными вариантами лечения, такими как постоянное наблюдение с помощью МРТ без дополнительного активного вмешательства, стереотаксическая радиохирurgia (SRS), фракционная лучевая терапия (FRT) и/или микрохирургия (MS).

[0609] В некоторых вариантах осуществления способы и композиции, описанные в данном документе, используются в качестве комбинированной терапии с постоянным наблюдением с помощью МРТ. В некоторых вариантах осуществления измерения с помощью МРТ могут идентифицировать рост опухоли, стаз опухоли или регрессию опухоли. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе способы в сочетании с непрерывным наблюдением без дополнительного вмешательства повышают степень сохранения слуха по сравнению со способами, в которых применяется только непрерывное наблюдение посредством МРТ.

[0610] В некоторых вариантах осуществления способы и композиции, описанные в данном документе, используются в качестве комбинированной терапии с радиохирургией (например, хирургией с помощью гамма-ножа), как известно в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления в опухоль доставляется однократная эффективная доза облучения (например, от 5 до 10 Гр облучения, от 7 до 12 Гр облучения, от 9 до 14 Гр облучения, от 11 до 16 Гр облучения, от 13 до 18 Гр облучения или от 12 до 17 Гр облучения) до или после лечения композициями и способами, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления комбинированная терапия с использованием способов и композиций, описанных в данном документе, снижает необходимые профили доз облучения, снижая вероятность того, что профили облучения могут перекрывать структуры, прилегающие к опухоли. В некоторых вариантах осуществления этот комбинированный терапевтический подход снижает вероятность индуцированной радиохирургией дисфункции структур черепного нерва или ствола головного мозга. В некоторых вариантах осуществления подходы комбинированной терапии снижают вероятность послеоперационной потери слуха, ассоциированной с повышенной дозой облучения улитки или ассоциированных с ней ядер ствола головного мозга. В некоторых вариантах осуществления подходы комбинированной терапии снижают вероятность послеоперационной гидроцефалии. В некоторых вариантах осуществления подходы комбинированной терапии снижают вероятность послеоперационного развития вторичного злокачественного новообразования. В некоторых вариантах осуществления комбинированная терапия направлена на замедление роста опухоли, остановку роста опухоли и/или уменьшение размера опухоли. В некоторых вариантах осуществления подходы комбинированной терапии повышают эффективность радиохирургии, например, повышают вероятность остановки роста опухоли, снижают потребность в дополнительном лечении, повышают вероятность сохранения слуха, снижают вероятность перманентной лицевой невротии, снижают вероятность невротии тройничного нерва и/или снижают

вероятность гидроцефалии.

[0611] В некоторых вариантах осуществления способы и композиции, описанные в данном документе, используются в качестве комбинированной терапии с фракционированной лучевой терапией, как известно в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления эффективная доза облучения доставляется в опухоль посредством нескольких микродоз (например, ~5 микродоз, ~10 микродоз, ~15 микродоз, ~20 микродоз, ~25 микродоз или ~30 микродоз) в течение нескольких недель (например, 1 неделя, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 7 недель, 8 недель, 9 недель, 10 недель, 11 недель, 12 недель или более 12 недель), которые в совокупности составляют одну большую дозу облучения опухоли (например, ~30 Гр, ~40 Гр, ~50 Гр ~60 Гр или ~70 Гр облучения), которая вводится до, во время или после лечения композициями и способами, описанными в данном документе. В некоторых вариантах осуществления подходы комбинированной терапии, как описано в данном документе, приводят к продолжительному повреждению опухоли с ингибированием неоваскуляризации, позволяя при этом окружающим тканям заживать между дозами. В некоторых вариантах осуществления подходы к комбинированной терапии, как описано в данном документе, повышают эффективность фракционированной лучевой терапии, например, увеличивая среднюю скорость остановки роста опухоли, увеличивая 5-летний актуаральный показатель выживаемости, снижая вероятность необходимости дополнительного лечения, увеличивая вероятность сохранения слуха, уменьшая вероятность развития невропатии лица, снижая вероятность развития невропатии тройничного нерва и/или снижая вероятность гидроцефалии.

[0612] В некоторых вариантах осуществления способы и композиции, описанные в данном документе, применяются в качестве комбинированной терапии с хирургическими вмешательствами, известными в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления такой подход к комбинированной терапии повышает эффективность хирургического вмешательства при одновременном снижении вероятности возникновения дополнительных хирургических осложнений, таких как повреждение черепно-мозговых нервов, подтекание спинномозговой жидкости (СМЖ) и/или послеоперационная инфекция. В некоторых вариантах осуществления такой комбинированный подход снижает вероятность того, что потребуется дополнительное лечение, увеличивает вероятность сохранения слуха, снижает вероятность постоянной лицевой невропатии, снижает вероятность острой заболеваемости, связанной со СМЖ пациентов, и/или снижает вероятность смертности.

[0613] Также в данном документе предложены хирургические способы лечения тугоухости (например, несиндромальной нейросенсорной тугоухости или синдромальной нейросенсорной тугоухости). В некоторых вариантах осуществления способ включает следующие этапы: осуществление в улитке человека первого разреза в первом месте разреза; и внутрикочлеарное введение терапевтически эффективного количества любой из представленных в данном документе композиций. В некоторых вариантах осуществления композицию вводят субъекту в первом месте разреза. В некоторых вариантах осуществления композицию вводят субъекту в первый разрез или через него.

[0614] В некоторых вариантах осуществления оценивали системное введение ингибиторов VEGF для лечения ВШ у пациентов с NF2, и результаты этих исследований предоставляют предварительные клинические доказательства применения ингибиторов VEGF для лечения ВШ. В некоторых вариантах осуществления пациенты с NF2 подвергаются повышенному риску при введении композиции, раскрытой в данном документе, поскольку они обычно имеют шванномы с обеих сторон, приводящие к ухудшению слуха на оба уха. В некоторых вариантах осуществления субъекту, имеющему NF2, не вводят композицию, раскрытую в данном документе. В некоторых вариантах осуществления субъекту, имеющему NF2, вводят композицию, раскрытую в данном документе, например, исходя из безопасности и эффективности композиции, раскрытой в данном документе, например, rAAV-анти-VEGF, доставляемую посредством одностороннего или двустороннего внутрикочлеарного введения.

[0615] В некоторых вариантах осуществления спорадические опухоли ВШ экспрессируют VEGF (Saito 2003; Cayé-Thomasen 2003, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки), и уровень экспрессии VEGF, например, коррелирует со скоростью роста опухоли (Cayé -Thomasen 2003; Cayé-Thomasen 2005, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки). В некоторых вариантах осуществления любого из способов, раскрытых в данном документе, у субъекта имеется прогрессирующий спорадический ВШ (например, определяемая как одиночная опухоль со скоростью роста не менее 20% при последовательных сканированиях), но чьи опухоли все еще достаточно малы, чтобы дополнительное наблюдение периодом в один год могло подвергнуть их высокому риску дальнейших осложнений, связанных с опухолью (кроме потери слуха). В некоторых вариантах осуществления субъект является взрослым, которому проводится или будет проведена инвазивная хирургическая резекция и/или лучевая терапия. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, раскрытых в данном документе, способ включает

оценку безопасной дозы, например, начальной дозы (в 8 раз ниже ожидаемого NOAEL). В некоторых вариантах осуществления начальная доза приводит к уровням экспозиции ингибитора VEGF в тканях и жидкостях в непосредственной близости от места расположения опухоли.

[0616] В некоторых вариантах осуществления композиции, как описано в данном документе (например, гAAV-анти-VEGF), могут достигать многих клеток-мишеней во внутреннем ухе посредством доставки в перилимфу. Перилимфа представляет собой жидкость, очень похожую по составу и по диффузионной непрерывности на спинномозговую жидкость (СМЖ) (Lysaght 2011, полностью включена в данный документ посредством ссылки). Перилимфа омывает большую часть сенсорных, нервных и поддерживающих клеток улитки и вестибулярной системы, расположенных в костном лабиринте внутреннего уха. Перилимфатическое пространство улитки, в которое в некоторых вариантах осуществления будут доставляться композиции, описанные в данном документе (например, содержащие гAAV-анти-VEGF), включает две лестницы или прохода: барабанную лестницу и лестницу преддверия, которые переходят друг в друга на вершине спирали улитки через геликотрему. Многие клетки внутреннего уха находятся в жидкостной непрерывности с перилимфой через интерстициальные пространства в ткани.

[0617] Внутрикохлеарное введение композиции гAAV-анти-VEGF с помощью устройства доставки, как описано в данном документе, обычно происходит через мембрану круглого окна (см. **фиг. 1**). В некоторых вариантах осуществления композиции, как описано в данном документе, доставляются индивидууму (например, млекопитающему, например, человеку) с использованием стерильного одноразового устройства доставки для внутрикохлеарного введения. В некоторых вариантах осуществления композиции, как описано в данном документе, доставляются в перилимфу внутреннего уха через мембрану круглого окна с вентиляционным отверстием, расположенным в основании стремени. В определенных вариантах осуществления подход к внутрикохлеарному введению включает введение композиций, описанных в данном документе, в барабанную перепонку через мембрану круглого окна, с отверстием в основании стремени в пределах овального окна, так что частицы гAAV перфузируются через барабанную перепонку, затем через лестницу преддверия через соединение в хеликотреме и следуют по пути жидкости к отверстию в основании стремени. В некоторых вариантах осуществления наличие отверстия, отличного от инъекционного порта, обеспечивает более равномерное и/или контролируемое распределение лекарственного средства по всей длине улитки и/предотвращает потенциальное пагубное повышение давления дополнительной жидкости во внутреннем

ухе. В некоторых вариантах осуществления этот подход к доставке также обеспечивает диффузию инъекционного препарата в вестибулярную систему. В некоторых вариантах осуществления процесс, подобный описанному в данном документе, может быть выполнен у пациентов с относительно нетравматическим доступом через наружный слуховой проход.

[0618] В некоторых вариантах осуществления любого предложенного в данном документе способа любую из композиций, описанных в данном документе, вводят субъекту в мембрану овального окна улитки или через нее. В некоторых вариантах осуществления любого предложенного в данном документе способа любую из композиций, описанных в данном документе, вводят субъекту в мембрану круглого окна улитки или через нее. В некоторых вариантах осуществления любого предложенного в данном документе способа композицию вводят с использованием медицинского устройства, способного создавать множество разрезов в мембране круглого окна. В некоторых вариантах осуществления медицинское устройство содержит множество микроигл. В некоторых вариантах осуществления медицинское устройство содержит множество микроигл, включающих, как правило, первый круговой аспект, где каждая микроигла имеет диаметр, по меньшей мере, около 10 микрон. В некоторых вариантах осуществления медицинское устройство содержит основание и/или резервуар, способный удерживать композицию. В некоторых вариантах осуществления медицинское устройство содержит множество полых микроигл, индивидуально содержащих просвет, через который возможно переносить композицию. В некоторых вариантах осуществления медицинское устройство содержит средство для создания, по меньшей мере, частичного вакуума.

[0619] В некоторых вариантах осуществления в данном документе раскрыто стерильное одноразовое средство доставки для введения раскрытой в данном документе композиции в перилимфу внутреннего уха через мембрану круглого окна с отверстием, расположенным в основании стремени. В некоторых вариантах осуществления это индивидуальное устройство имеет преимущества перед имеющимися материалами и хирургическими инструментами общего назначения, как в отношении безопасности, так и в отношении потенциальной эффективности терапевтического средства, поскольку оно было специально разработано для внутрикохлеарного пути введения. Важные элементы конструкции устройства доставки включают: обеспечение стерильности вводимой жидкости; минимизацию попадания пузырьков воздуха во внутреннее ухо; возможность точной подачи небольших объемов с регулируемой скоростью потока (в сочетании с использованием стандартного насоса); возможность визуализации мембраны круглого окна и доставки хирургом через наружный слуховой проход; минимизацию повреждения

мембраны круглого окна или улитковых структур за пределами мембраны круглого окна; и минимизацию обратного оттока через мембрану круглого окна. В некоторых вариантах осуществления индивидуальное специальное устройство будет удалено из уха после доставки около 0,09 мл композиции, описанной в данном документе, например, гAAV-анти-VEGF, в перилимфу улитки.

[0620] Доставка во внутреннее ухо является сложной задачей в связи с уязвимостью и недоступностью сенсорных клеток и несенсорных поддерживающих клеток/структур, что ограничивает тип хирургических доступов без непреднамеренного повреждения. В некоторых вариантах осуществления соответствующая вентиляция заполненного жидкостью пространства улитки предотвращает повреждение внутреннего уха из-за увеличения объема жидкости.

[0621] Структура и функция внутреннего уха млекопитающих в значительной степени сохранена у всех млекопитающих (Manley 2017, полностью включена в данный документ посредством ссылки), хотя и имеются различия в сроке развития улитки в период беременности и рождения у приматов и других млекопитающих. Развитие улитки у мышей все еще продолжается на момент рождения, с началом функционирования слуха примерно на 12-й день постнатального развития (P12; Bulankina 2012, полностью включена в данный документ посредством ссылки). Люди, напротив, полностью развиваются внутриутробно и начинают слышать на 25-28-й неделе беременности (Litovsky 2015, полностью включена в данный документ посредством ссылки). Два важных структурных аспекта зрелого внутреннего уха, которые необходимо учитывать при разработке потенциальных вариантов лечения и их доставки в ухо: 1) различия в размерах внутреннего уха у разных видов; и 2) проходимость водопровода улитки, который проходит между перилимфой улитки и спинномозговой жидкостью (СМЖ). В некоторых вариантах осуществления любого из раскрытых в данном документе способов объем улитки используется для экстраполяции дозы, например, от животных к человеку.

[0622] В некоторых вариантах осуществления, когда субъектом является грызун, например, мышь, хирургический доступ, описанный в Yoshimura et al., 2018, который включает доставку через мембрану круглого окна с фенестрацией заднего полукружного канала, который продемонстрировал эффективность и надежность, применяется трансдукция, не зависящая от возраста животного на момент инъекции (публикация Yoshimura 2018, полностью включена в данный документ посредством ссылки). Осуществляется заушной разрез для доступа к височной кости. Часть грудино-ключично-сосцевидной мышцы рассекают, чтобы обнажить слуховой пузырь. Отологическим

сверлом диаметром от 0,5 до 0,6 мм делают небольшое отверстие в пузыре; затем отверстие расширяют, чтобы визуализировать стременную артерию и мембрану круглого окна. Фенестрацию заднего полукружного канала выполняют отологическим сверлом (диаметром 0,5–0,6 мм), чтобы оно служило отверстием внутреннего уха во время кохлеарного введения. В мембрану круглого окна проводят устройство доставки для мышей, состоящее из боросиликатной капиллярной пипетки и 10 мкл шприца Гамильтона, и 1 мкл раствора, содержащего вирусные частицы (приблизительно 40-50% от общего объема внутреннего уха), доставляют через мембрану круглого окна в барабанную лестницу со скоростью 300 нл/мин.

[0623] В некоторых вариантах осуществления, когда субъект является ННР, выполняют постаурикулярный разрез и выполняют рассечение мягких тканей до уровня надкостницы. В некоторых вариантах надкостницу рассекают и приподнимают, чтобы обнажить сосцевидный отросток. Кортикальная мастоидэктомия выполняется с помощью комбинации высокоскоростной резки и алмазных боров. Затем открывают лицевой карман, что позволяет адекватно визуализировать круглое и овальное окна (OW). Фенестрацию основания стремени в OW выполняют с помощью иглы Розена. Как и в других моделях, фенестрация позволяет вводить больший объем без повреждения внутреннего уха; кроме того, создание отверстия позволяет раствору, содержащему частицы гAAV, протечь к верхушке улитки. Тридцать мкл раствора, содержащего частицы гAAV (приблизительно от 40 до 50% от общего объема внутреннего уха), доставляют через мембрану круглого окна со скоростью 30 мкл/мин.

[0624] В некоторых вариантах осуществления, когда субъектом является млекопитающее, например, человек, используется менее инвазивный доступ через наружный слуховой проход, например, поскольку соответствующие структуры являются относительно большими даже при рождении. В некоторых вариантах осуществления процедура клинического введения представляет собой трансканальную диагностическую тимпанотомию и лазерную микростапедотомию (с использованием отологического лазера на титанилфосфате калия [КТР] или CO₂ для создания небольшого отверстия [примерно 0,25 мм] в основании стремени) с последующей инъекцией в круглое окно для доставки около 0,09 мл (или 90 мкл, приблизительно от 40 до 50% от общего объема внутреннего уха) раствора, содержащего описанную в данном документе композицию, например, частицы гAAV-анти-VEGF, через мембрану круглого окна в течение трехминутного периода. В некоторых вариантах осуществления создание отверстия служит для предотвращения потенциально опасного повышения внутрилабиринтного давления.

Трансканальная диагностическая тимпанотомия представляет собой стандартную процедуру, применяемую для обнажения структур среднего уха; трансканальная диагностическая тимпанотомия часто сопровождается лазерной стапедэктомией (удалением основания стремени) или стапедотомией (созданием отверстия в основании стремени), например, у пациентов с отосклерозом.

[0625] В некоторых вариантах осуществления настоящее раскрытие описывает подход к доставке, в котором применяют минимально инвазивную, общепринятую хирургическую технику для доступа к среднему уху и/или внутреннему уху через наружный слуховой проход. Процедура включает открытие одного из физических барьеров между средним и внутренним ухом в овальном окне и последующее применение раскрытого в данном документе устройства, например, как показано на фиг. 33-36 (или микрокатетер) для доставки композиции, раскрытой в данном документе, с регулируемой скоростью потока и в фиксированном объеме через мембрану круглого окна.

[0626] В некоторых вариантах осуществления хирургические процедуры для млекопитающих (например, грызунов (например, мышей, крыс, хомяков или кроликов), приматов (например, НР (например, макак, шимпанзе, обезьян или человекообразных обезьян) или людей) могут включать создание отверстия для увеличения скорости передачи вектора AAV по длине улитки. В некоторых вариантах осуществления отсутствие вентиляции во время операции может привести к более низкой скорости трансдукции клеток улитки вектора AAV по сравнению со скоростью трансдукции клеток улитки вектора AAV после операций, выполненных с вентиляцией. В некоторых вариантах осуществления вентиляция способствует скорости трансдукции около 75-100% ИС (внутренних волосковых клеток) по всей улитке. В некоторых вариантах осуществления вентиляция обеспечивает скорость трансдукции ИС около 50-70%, около 60-80%, около 70-90% или около 80-100% у основания улитки (см. **фиг. 28**). В некоторых вариантах осуществления вентиляция обеспечивает скорость трансдукции ИС около 50-70%, около 60-80%, около 70-90% или около 80-100% на верхушке улитки (см. **фиг.. 28**).

[0627] Устройство для доставки, описанное в данном документе, может быть помещено в стерильное поле операционной, а конец трубки может быть удален из стерильного поля и соединен со шприцем, в который загружена композиция, описанная в данном документе (например, один или более векторов AAV), который установлен в насосе. После соответствующей заполнения системы для удаления воздуха можно провести иглу через среднее ухо под визуальным контролем (хирургический микроскоп, эндоскоп и/или камера на дистальном конце). Иглу (или микроиглу) можно использовать для прокола RWM. Игла

может быть введена до тех пор, пока стопор не коснется RWM. Затем устройство можно удерживать в этом положении во время доставки описанной в данном документе композиции с регулируемой скоростью потока во внутреннее ухо в течение выбранного периода времени. В некоторых вариантах осуществления скорость потока (или скорость инфузии) может включать скорость около 30 мкл/мин, или от около 25 мкл/мин до около 35 мкл/мин, или от около 20 мкл/мин до около 40 мкл/мин, или от около 20 мкл/мин до около 70 мкл/мин, или от около 20 мкл/мин до около 90 мкл/мин, или от около 20 мкл/мин до около 100 мкл/мин. В некоторых вариантах осуществления скорость потока составляет около 20 мкл/мин, около 30 мкл/мин, около 40 мкл/мин, около 50 мкл/мин, около 60 мкл/мин, около 70 мкл/мин, около 80 мкл/мин, около 90 мкл/мин или около 100 мкл/мин. В некоторых вариантах осуществления выбранная продолжительность времени (то есть время, в течение которого протекает композиция, раскрытая в настоящем документе) может составлять около 3 минут, или от около 2,5 минут до около 3,5 минут, или от около 2 минут до около 4 минут, или от около 1,5 минут до около 4,5 минут, или от около 1 минуты до около 5 минут. В некоторых вариантах осуществления общий объем раскрытой в данном документе композиции, которая протекает во внутреннее ухо, может составлять около 0,09 мл, или от около 0,08 мл до около 0,10 мл, или от около 0,07 мл до около 0,11 мл. В некоторых вариантах осуществления общий объем раскрытой в данном документе композиции составляет от около 40% до около 50% объема внутреннего уха.

[0628] После завершения доставки устройство может быть удалено. В некоторых вариантах осуществления устройство, описанное в данном документе, может быть сконфигурировано как одноразовое изделие для однократного применения. В других вариантах осуществления устройство, описанное в данном документе, может быть сконфигурировано как стерилизуемое изделие для многократного применения, например, со сменным и/или стерилизуемым подбороком иглы. Одноразовые устройства можно надлежащим образом утилизировать (например, в контейнере для биологически опасных острых предметов) после завершения введения.

[0629] В некоторых вариантах осуществления композиция, раскрытая в данном документе, содержит множество конструкций гAAV. В некоторых вариантах осуществления, когда в композицию включено более одной конструкции гAAV, конструкции гAAV отличаются друг от друга. В некоторых вариантах осуществления конструкция гAAV содержит область, кодирующую анти-VEGF, например, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит частицу гAAV, включающую конструкцию AAV, описанную в данном документе. В некоторых

вариантах осуществления частица гAAV инкапсулирована капсидом Anc80. В некоторых вариантах осуществления капсид Anc80 содержит полипептид SEQ ID NO: 89. В некоторых вариантах осуществления капсид Anc80 содержит полипептид SEQ ID NO: 113. В некоторых вариантах осуществления капсид Anc80 содержит полипептид SEQ ID NO: 114.

[0630] В некоторых вариантах осуществления композиция, раскрытая в данном документе, может быть введена субъекту с помощью хирургической процедуры. В некоторых вариантах осуществления введение, например, с помощью хирургической процедуры, включает инъекцию композиции, описанной в данном документе, с помощью устройства для доставки, как описано в данном документе, во внутреннее ухо. В некоторых вариантах осуществления описанная в данном документе хирургическая процедура включает выполнение трансканальной тимпанотомии; выполнение лазерной микростапедотомии; и инъекцию композиции, раскрытой в данном документе, через устройство доставки, как описано в данном документе, во внутреннее ухо.

[0631] В некоторых вариантах осуществления хирургическая процедура включает выполнение трансканальной тимпанотомии; выполнение лазерной микростапедотомии; инъекцию композиции, раскрытой в данном документе, через устройство доставки, как описано в данном документе, во внутреннее ухо; нанесение герметика вокруг круглого окна и/или овального окна субъекта; опускание тимпаномеатального лоскута субъекта в анатомическое положение.

[0632] В некоторых вариантах осуществления хирургическая процедура включает выполнение трансканальной тимпанотомии; подготовку круглого окна субъекта; выполнение лазерной микростапедотомии; подготовку как устройства для доставки, как описано в данном документе, так и композиции, раскрытой в данном документе, для доставки во внутреннее ухо; инъекцию раскрытой в данном документе композиции через устройство доставки во внутреннее ухо; нанесение герметика вокруг круглого окна и/или овального окна субъекта; опускание тимпаномеатального лоскута субъекта в анатомическое положение.

[0633] В некоторых вариантах осуществления выполнение лазерной микростапедотомии включает использование отологического лазера на КТР и/или отологического лазера на CO₂.

[0634] В качестве другого примера композицию, раскрытую в данном документе, вводят с использованием устройства и/или системы, специально разработанной для внутрикохлеарного пути введения. В некоторых вариантах осуществления элементы

конструкции описанного в данном документе устройства могут включать: поддержание стерильности вводимой жидкости; минимизацию попадания пузырьков воздуха во внутреннее ухо; способность точно доставлять небольшие объемы с контролируемой скоростью; доставку через наружный слуховой проход хирургом; минимизацию повреждения мембраны круглого окна (RWM) или внутреннего уха, например, структур улитки за пределами RWM; и/или минимизацию протекания вводимой жидкости через RWM.

[0635] Устройства, системы и способы, представленные в данном документе, также описывают потенциальную возможность безопасной и эффективной доставки композиции во внутреннее ухо для лечения состояний и нарушений, при которых будет полезна доставка композиции, раскрытой в данном документе, во внутреннее ухо, включая, но не ограничиваясь ими, например, нарушения слуха, как описано в данном документе. В качестве другого примера, путем создания отверстия в основании стремени и введения через RWM раскрытая в данном документе композиция распределяется по всей улитке с минимальным разбавлением в месте воздействия. Разработка описанных устройств позволяет проводить процедуру хирургического введения через наружный слуховой проход человека. Описанные устройства можно удалять из уха после введения некоторого количества жидкости в перилимфу улитки. У субъектов устройство можно продвигать через наружный слуховой проход либо под хирургическим микроскопическим контролем, либо вместе с эндоскопом.

[0636] Иллюстративное устройство для применения в любом из раскрытых в данном документе способов описано на **фиг. 29-32**. На **фиг.29** показано иллюстративное устройство 10 для доставки жидкости во внутреннее ухо. Устройство 10 включает в себя рифленую рукоятку 12 и адгезив для дистальной рукоятки 14 (например, эпоксидный состав, такой как Loctite 4014), который соединяется с телескопическим держателем иглы гипотрубки 24. Рифленая рукоятка 12 (или часть рукоятки) может иметь рифленые элементы и/или канавки для улучшения захвата. Рифленая рукоятка 12 (или часть рукоятки) может иметь толщину от около 5 мм до около 15 мм, или от около 5 мм до около 12 мм, или от около 6 мм до около 10 мм, или от около 6 мм до около 9 мм, или от около 7 мм до около 8 мм. Рифленая рукоятка 12 (или часть рукоятки) может быть полой, чтобы жидкость могла проходить через устройство 10 во время применения. Устройство 10 может также включать адгезив проксимальной рукоятки 16 на проксимальном конце 18 рифленой рукоятки 12, подбор иглы 26 (показано на **фиг. 30**) со стопором 28 (показан на **фиг. 30**) на дистальном конце 20 устройства 10 и элемент для снятия натяжения 22. Элемент для снятия

натяжения 22 может состоять из материала Santoprene, материала Pebax, полиуретанового материала, силиконового материала, нейлонового материала и/или термопластичного эластомера. Телескопический держатель 24 иглы гипотубуса окружает и поддерживает изогнутую иглу 38 (показанную на **фиг. 30**), расположенную внутри нее.

[0637] По-прежнему со ссылкой на **фиг. 29**, стопор 28 может состоять из термопластичного материала или пластикового полимера (такого как полимер, отверждаемый УФ-излучением), а также из других подходящих материалов и может использоваться для предотвращения введения изогнутой иглы 38 слишком далеко в слуховой проход (например, чтобы предотвратить введение изогнутой иглы 38 в боковую стенку или другую структуру внутреннего уха). Устройство 10 также может включать сужающуюся часть 23, расположенную между рифленной рукояткой 12 и адгезивом 14 дистальной рукоятки, который соединен с телескопическим иглодержателем гипотрубки 24. Рифленная рукоятка 12 (или часть рукоятки) может включать сужающуюся часть 23 на дистальном конце части рукоятки 12. Устройство 10 может также включать в себя трубку 36, плавно соединенную с проксимальным концом 16 устройства 10 и выступающую в качестве линии впуска жидкости, соединяющей устройство с расположенными выше по компонентами (например, насосом, шприцем и/или расположенными выше компонентами, которые в некоторых вариантах осуществления, могут быть соединены с системой управления и/или источником питания (не показан)). В некоторых вариантах осуществления изогнутая игла 38 (показана на **фиг. 30**) проходит от дистального конца 20 через телескопический иглодержатель гипотрубки 24, через сужающуюся часть 23, через рифленную рукоятку 12 и через элемент для снятия натяжения 22 и плавно соединяется непосредственно с трубкой 36. В других вариантах осуществления изогнутая игла 38 плавно соединяется полым внутренним пространством рифленной рукоятки (например, через телескопический иглодержатель гипотрубки 24), который, в свою очередь, плавно соединяется на проксимальном конце 16 с трубкой 36. В вариантах осуществления, где изогнутая игла 38 не проходит полностью через внутреннюю часть устройства 10, площадь контакта (например, между перекрывающимися вложенными друг в друга гипотрубками 42), допуски и/или герметики между сопрягающимися компонентами должны быть достаточными для предотвращения вытекания терапевтической жидкости из устройства 10 (которое работает при относительно низком давлении (например, от около 1 Па до около 50 Па, или от около 2 Па до около 20 Па, или от около 3 Па до около 10 Па)).

[0638] На **фиг. 30** показан вид сбоку подбора 26 изогнутой иглы в соответствии с аспектами раскрытых вариантов осуществления данного изобретения. Подбор 26

изогнутой иглы включает иглу 38, которая имеет изогнутую часть 32. Подбор 26 изогнутой иглы также может включать стопор 28, соединенный с изогнутой частью 32. Изогнутая часть 32 включает изогнутый под углом наконечник 34 на дистальном конце 20 устройства 10 для прокалывания мембраны уха (например, RWM). Игла 38, изогнутая часть 32 и изогнутая под углом верхняя часть 34 являются полыми, так что через них может протекать жидкость. Угол 46 (как показано на **фиг. 33**) изогнутой части 32 может быть разным. Геометрия стопора 28 может быть цилиндрической, дискообразной, кольцеобразной, куполообразной и/или другой подходящей формы. Стопор 28 может быть отформован на изогнутой части 32. Например, стопор 28 может быть расположен концентрически вокруг изогнутой части 32 с использованием адгезива или компрессионного фитинга. Примеры адгезивов включают адгезив, отверждаемый УФ-излучением (такой как Dymax 203A-CTH-F-T), эластомерные адгезивы, термореактивные адгезивы (такие как эпоксидные или полиуретановые) или эмульсионные адгезивы (такие как поливинилацетат). Стопор 28 устанавливается концентрически вокруг изогнутой части 32, так что скошенный под углом кончик 34 вставляется в ухо на желаемую глубину введения. Изогнутая игла 38 может быть сформирована из прямой иглы с использованием пошагового формования, а также других подходящих методов.

[0639] На **фиг. 31** показан вид в перспективе иллюстративного устройства 10 для доставки жидкости во внутреннее ухо. Трубка 36 может иметь длину от около 1300 мм (размер 11 на **фиг. 31**) до около 1600 мм, или от около 1400 мм до около 1500 мм, или от около 1430 мм до около 1450 мм. Элемент для снятия натяжения 22 может иметь длину от около 25 мм до около 30 мм (размер 15 на **фиг. 31**) или от около 20 мм до около 35 мм. Рукоятка 12 может иметь длину около 155,4 мм (размер 13 на **фиг. 31**), или от около 150 до около 160 мм, или от около 140 до около 170 мм. Телескопический иглодержатель гипотрубки 24 может иметь две или более вложенных друг в друга гипотрубок, например три вложенные друг в друга гипотрубки 42А, 42В и 42С, или четыре вложенные друг в друга гипотрубки 42А, 42В, 42С и 42D. Общая длина гипотрубок 42А, 42В, 42С и наконечника в сборе 26 (размер 17 на **фиг. 31**) может составлять от около 25 мм до около 45 мм, или от около 30 мм до около 40 мм, или около 35 мм. Кроме того, телескопический иглодержатель гипотрубки 24 может иметь длину около 36 мм, или от около 25 мм до около 45 мм, или от около 30 мм до около 40 мм. Каждая из трех вложенных друг в друга гипотрубок 42А, 42В и 42С может иметь длину 3,5 мм, 8,0 мм и 19,8 мм, соответственно, плюс или минус около 20%. Самая внутренняя вложенная гипотрубка (или самая узкая часть) телескопического держателя иглы гипотрубки 24 может быть расположена

концентрически вокруг иглы 38.

[0640] На **фиг. 32** показан вид в перспективе подбора 26 изогнутой иглы, соединенного с дистальным концом 20 устройства 10, в соответствии с аспектами раскрытых вариантов осуществления данного изобретения. Как показано на **фиг. 32**, подбор 26 изогнутой иглы может включать иглу 38, соединенную с изогнутой частью 32. В других вариантах осуществления изогнутая игла 38 может представлять собой одинарную иглу (например, прямую иглу, которую затем изгибают так, что она образует необходимый угол 46). Игла 38 может представлять собой иглу калибра 33 или может включать калибр от около 32 до около 34 или от около 31 до 35. При меньших калибрах необходимо следить за тем, чтобы трубка 36 не перегибалась и не повреждалась. Игла 38 может быть присоединена к рукоятке 12 для безопасного и точного введения иглы 38 во внутреннее ухо. Как показано на **фиг. 32**, подбор 26 изогнутой иглы может также включать стопор 28, расположенный вокруг изогнутой части 32. На **фиг. 32** также показано, что изогнутая часть 32 может включать наклонный наконечник 34 для прокалывания мембраны уха (например, RWM). Стопор 28 может иметь высоту 48 около 0,5 мм, или от около 0,4 мм до около 0,6 мм, или от около 0,3 мм до около 0,7 мм. Изогнутая часть 32 может иметь длину 52 около 1,45 мм или от около 1,35 мм до около 1,55 мм, или от около 1,2 мм до около 1,7 мм. В других вариантах осуществления изогнутая часть 32 может иметь длину более 2,0 мм, так что расстояние между дистальным концом стопора 28 и дистальным концом изогнутого наконечника 34 составляет от примерно 0,5 мм до примерно 1,7 мм или примерно от 0,6 мм до примерно 1,5 мм, или от примерно 0,7 мм до примерно 1,3 мм, или от примерно 0,8 мм до примерно 1,2 мм. На **фиг. 32** показано, что стопор 28 может иметь цилиндрическую, дискообразную и/или куполообразную геометрию. Специалисту в данной области техники будет понятно, что можно использовать и другие геометрические формы.

Способы лечения субъекта

[0641] В настоящем изобретении предусмотрено, среди прочего, что технологии, описанные в данном документе, могут быть использованы для лечения основного заболевания и/или симптомов у субъекта, страдающего или подверженного риску развития отологического заболевания, характеризующегося неоваскуляризацией (например, акустической невромы, например, ВШ).

[0642] В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту конструкции (например, конструкции гAAV), описанной в данном документе, частицы (например, частицы гAAV) или композиции, описанной в данном документе. В некоторых

вариантах осуществления способ представляет собой способ лечения. В некоторых вариантах осуществления субъект является субъектом, страдающим или подверженным риску развития отологического заболевания, характеризующегося неоваскуляризацией (например, акустической невромы, например, ВШ).

[0643] В некоторых вариантах осуществления введение конструкции (например, конструкции гAAV), описанной в данном документе, частицы (например, частицы гAAV) или композиции, описанной в данном документе, субъекту может облегчить и/или улучшить состояние в связи с одним или более симптомами, ассоциированными с отологическим заболеванием, характеризующимся неоваскуляризацией (например, акустической невромы, например, ВШ). Симптомы могут включать, например, потерю слуха, дегенерацию волосковых клеток, изменение биохимического состава жидкостей внутреннего уха, повышенный уровень внутрилабиринтного белка, эндолимфатический гидропс, обструкцию улиткового отверстия, внутрилабиринтное кровоизлияние, нарушение кровоснабжения улитки, шум в ушах, головокружение, некупируемую головную боль, невropатию лицевого нерва, невropатия тройничного нерва, паралич лицевого нерва, парестезию лицевого нерва, гидроцефалию, грыжу мозжечка и/или летальный исход.

[0644] В некоторых вариантах осуществления отологическое заболевание, характеризующееся неоваскуляризацией (например, акустические невромы, например, ВШ), связано с генной мутацией (например, делеционной мутацией, мутацией сдвига рамки считывания, нонсенс-мутацией, гипоморфной мутацией, гиперморфной мутацией, неоморфной мутацией, аберрантной сверхэкспрессией, аберрантной недостаточной экспрессией и т. д.). В некоторых вариантах осуществления субъект, страдающий отологическим заболеванием, характеризующимся неоваскуляризацией (например, акустическими невромами, например, ВШ), или подверженный риску его возникновения, может иметь мутацию в гене, связанном с прогрессированием отологической опухоли, которая может быть охарактеризована, как описано в данном документе.

[0645] В некоторых вариантах осуществления определяют генетические и/или симптоматические характеристики субъекта до, во время и/или после лечения с помощью технологий, описанных в данном документе (например, с ПЦР в реальном времени, количественной ПЦР в реальном времени, вестерн-блоттинга, иммунопреципитации, иммуногистохимии, масс-спектрометрии или иммунофлуоресценцией, непрямого фенотипического определения экспрессии гена и/или белка (например, с помощью функциональных тестов слуха, ABR, DPOAE и т. д.) и т. д.). В некоторых вариантах

осуществления субъект, страдающий или подверженный риску развития отологического заболевания, характеризующегося неоваскуляризацией (например, акустической невромой, ВШ), может иметь ассоциированное с ним болезненное состояние, охарактеризованное посредством взятия образцов ткани (например, включающих одну или более клеток внутреннего уха, например, включающих одну или более волосковых клеток и/или одну или более поддерживающих клеток). В некоторых вариантах осуществления ткани оценивают с помощью морфологического анализа для определения морфологии волосковых клеток и/или поддерживающих клеток до, во время и/или после выполнения любых технологий (например, методологий, например, композиций, например, композиций, содержащих конструкции, и/или частицы и т.д.), как описано в данном документе. В некоторых таких вариантах осуществления могут быть выполнены стандартные иммуногистохимические или гистологические анализы. В некоторых вариантах осуществления, если клетки используются *in-vitro* или *ex-vivo*, могут быть выполнены дополнительные иммуноцитохимические или иммуногистохимические анализы. В некоторых вариантах осуществления один или более анализов одного или более белков или транскриптов (например, вестерн-блоттинг, ELISA, полимеразная цепная реакция) можно проводить на одном или более образцах субъекта или клеточных популяциях *in vitro*.

[0646] В некоторых вариантах осуществления введение субъекту конструкции (например, конструкции гAAV), описанной в данном документе, частицы (например, частицы гAAV) или композиции, описанной в данном документе, улучшает иммуногистохимическую оценку субъекта (например, результаты тестов, как описано выше) по сравнению с результатами иммуногистохимических анализов, выполненных до лечения с помощью технологий, описанных в данном документе, или при сравнении с контрольной популяцией.

Лечение субъекта для улучшения симптомов потери слуха, шума в ушах, головокружения и/или нарушения речи

[0647] В некоторых вариантах осуществления субъект, страдающий отологическим заболеванием, характеризующимся неоваскуляризацией (например, акустическими невромами, например, ВШ), или подверженный риску его возникновения, может получать схему лечения, характеризующуюся нарушением функции слуха. В некоторых вариантах осуществления функциональность схемы лечения характеризуется функцией слуха, при этом такая функция слуха определяется у индивидуума с использованием измерений акустических стволовых вызванных потенциалов (ABR) до, после и/или во время лечения

композициями и способами, описанными в данном документе. В некоторых вариантах осуществления функциональность схемы лечения характеризуется функцией слуха, при этом такая функция слуха определяется у индивидуума с использованием измерений отоакустической эмиссии на частоте продукта искажения (DPOAE) до, после и/или во время лечения композициями и способами, описанными в данном документе. В некоторых таких вариантах осуществления измерения слуха проводят на одном или обоих ушах субъекта. В некоторых таких вариантах осуществления записи сравнивают с предыдущими записями того же субъекта и/или с известными пороговыми значениями таких измерений ответов, используемых для определения, например, потери слуха в сравнении с допустимыми диапазонами слышимости, определяемыми как нормальный слух. В некоторых вариантах осуществления у субъекта регистрируют измерения ABR и/или DPOAE до получения какого-либо лечения. В некоторых вариантах осуществления у субъекта, получающего лечение с применением одной или более технологий, описанных в данном документе, после лечения будут наблюдаться улучшения показателей ABR и/или DPOAE по сравнению с показателями до лечения. В некоторых вариантах осуществления измерения ABR и/или DPOAE проводят после проведения лечения и через регулярные интервалы в рамках последующего наблюдения после лечения. В некоторых вариантах осуществления лечение с помощью технологий, описанных в данном документе, улучшает оценку результатов и болезни тестов пациентов (например, анализы, как описано выше) по сравнению с тестами, проведенными до лечения с использованием технологий, описанных в данном документе, или по сравнению с контрольной популяцией.

[0648] В некоторых вариантах осуществления субъект, страдающий отологическим заболеванием, характеризующимся неоваскуляризацией (например, акустическими невромами, например, ВШ), или подверженный риску его возникновения, может иметь схему лечения, которая характеризуется функцией слуха как функцией речи, пониманием речи и/или распознаванием тонов. В некоторых вариантах осуществления функциональность схемы лечения характеризуется определением распознавания речевых образов и/или определяется логопедом. В некоторых вариантах осуществления функциональность схемы терапевтического лечения с использованием технологий, описанных в данном документе, определяется с помощью тестирования чистого тона. В некоторых вариантах осуществления функциональность схемы терапевтического лечения с использованием технологий, описанных в данном документе, определяется с помощью тестирования костной проводимости. В некоторых вариантах осуществления функциональность схемы терапевтического лечения с использованием технологий,

описанных в данном документе, определяется с помощью тестирования акустического рефлекса. В некоторых вариантах осуществления функциональность схемы терапевтического лечения с использованием технологий, описанных в данном документе, определяется с помощью тимпанометрии. В некоторых вариантах осуществления функциональность схемы терапевтического лечения с использованием технологий, описанных в данном документе, определяется любой комбинацией анализа слуха, известной в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления функциональность схемы терапевтического лечения с использованием технологий, описанных в данном документе, измеряют комплексно и/или на одном или обоих ушах субъекта. В некоторых вариантах осуществления функциональность терапевтической схемы лечения с помощью технологий, описанных в данном документе, заключается в том, что записи и/или профессиональный анализ, сделанные после окончания схемы, сравниваются с предыдущими записями и/или анализом для того же субъекта и/или известными пороговыми значениями таких измерений ответов, используемых для определения, например, потери слуха по сравнению с приемлемыми диапазонами слуха, определяемыми как нормальный слух. В некоторых вариантах осуществления субъекту, подлежащему лечению, проводят распознавание спектра речевых сигналов, тестирование чистого тона, тестирование костной проводимости, тестирование акустического рефлекса и/или измерения методом тимпанометрии и/или анализ до получения какого-либо лечения. В некоторых вариантах осуществления у субъекта, получающего лечение с применением одной или более технологий, описанных в данном документе, после лечения будут наблюдаться улучшения в распознавании спектра речевых сигналов, тестировании чистого тона, тестировании костной проводимости, тестировании акустического рефлекса и/или измерениях методом тимпанометрии по сравнению с состоянием до лечения. В некоторых вариантах осуществления распознавание спектра речевых сигналов, тестирование чистого тона, тестирование костной проводимости, тестирование акустического рефлекса и/или измерения методом тимпанометрии проводят после проведения лечения и через регулярные интервалы в рамках последующего наблюдения после лечения. В некоторых вариантах осуществления лечение с помощью технологий, описанных в данном документе, улучшает оценку результатов и болезни тестов пациентов (например, анализы, как описано выше) по сравнению с тестами, проведенными до лечения с использованием технологий, описанных в данном документе, или по сравнению с контрольной популяцией.

[0649] В некоторых вариантах осуществления субъект, страдающий отологическим заболеванием, характеризующимся неоваскуляризацией (например, акустическими

невромами, например, ВШ), или подверженный риску его возникновения, может пройти оценку эффективности лечения с помощью способа, включающего оценку поведенческой аудиометрии. В некоторых вариантах осуществления оценка поведенческой аудиометрии включает аудиометрию чистого тона с воздушными и костными кривыми с соответствующей маскировкой, речевую аудиометрию, анализ слов в тишине или анализ слов на фоне шума. В некоторых вариантах осуществления оценка поведенческой аудиометрии включает электрофизиологическую аудиометрию путем тестирования акустических стволовых вызванных потенциалов. В некоторых вариантах осуществления оценка поведенческой аудиометрии включает стандартизированные опросники: ННИА: опросник нарушений слуха для взрослых, DHI: шкала для оценки головокружения, THI: шкала для оценки головокружения шума в ушах, PANQOL: Пенсильванская шкала оценки качества жизни (QoL) при акустической невrome. В некоторых вариантах осуществления лечение с помощью технологий, описанных в данном документе, улучшает оценку результатов и болезни тестов пациентов (например, анализы, как описано выше) по сравнению с тестами, проведенными до лечения с использованием технологий, описанных в данном документе, или по сравнению с контрольной популяцией.

[0650] В некоторых вариантах осуществления субъект, страдающий отологическим заболеванием, характеризующимся неоваскуляризацией (например, акустическими невромами, например, ВШ), или подверженный риску его возникновения, может находиться под наблюдением посредством оценки отологических, вестибулярных и/или системных нежелательных явлений, а также результатов гематологических анализов, клинической биохимия крови и/или результатов анализа мочи. В некоторых вариантах осуществления у субъекта, проходящего лечение с помощью технологий, описанных в данном документе, можно оценить уровни анти-VEGF белка в крови и ДНК конструкции в мазках из ушей, мазках из носа, слюне и крови. В некоторых вариантах осуществления у субъекта, проходящего лечение с помощью технологий, описанных в данном документе, может быть взята кровь для оценки потенциальных гуморальных иммунных ответов на капсид и/или секретируемый трансгенный продукт.

[0651] В некоторых вариантах осуществления субъект, страдающий отологическим заболеванием, характеризующимся неоваскуляризацией (например, акустическими невромами, например, ВШ), или подверженный риску его возникновения, может подвергаться анализу функциональности терапии с помощью тестов ABR. В некоторых вариантах осуществления тест ABR измеряет, реагируют ли улитка, улитковый нерв и ствол головного мозга субъекта на каждый звуковой стимул, такие тесты часто используются в

качестве меры оценки здоровья уха. В некоторых вариантах осуществления в дополнение к измерению самой низкой интенсивности каждой частоты стимула, которую ствол головного мозга субъекта может надежно обработать (порог), можно измерить амплитуду волны I в ответ на надпороговые стимулы, чтобы оценить целостность афферентного потока информация от волосковых клеток улитки к слуховому нерву. В некоторых вариантах осуществления пороги ABR могут предоставлять важную информацию о самом низком уровне звука, который проходит через ухо субъекта и обрабатывается стволом головного мозга. Надпороговые ответы в амплитуде волны I ABR все чаще используются в качестве показателя целостности связи ленточного синапса между основанием внутренних волосковых клеток и дендритами слухового нерва. В некоторых вариантах осуществления лечение с помощью технологий, описанных в данном документе, улучшает оценку результатов ABR пациентов по сравнению с тестами, проведенными до лечения с использованием технологий, описанных в данном документе, или по сравнению с контрольной популяцией.

[0652] В некоторых вариантах осуществления субъект, страдающий отологическим заболеванием, характеризующимся неоваскуляризацией (например, акустическими невромами, например, ВШ), или подверженный риску его возникновения, может подвергаться анализу функциональности терапии с помощью тестов на основе DPOAE. В некоторых вариантах осуществления DPOAE — это звуки, создаваемые движением наружных волосковых клеток улитки, которые измеряются неинвазивно в ушном канале с помощью комбинации преобразователя и микрофона. В некоторых вариантах осуществления размер вызванных DPOAE является полезной мерой функции наружных волосковых клеток. В некоторых вариантах осуществления в ухо подаются два основных тона (f_1 и f_2), вызывающие механические вибрации, которые вызывают изменения давления в улитковых жидкостях на частоте стимула и искажения. В некоторых вариантах осуществления эти изменения давления приводят к обратному воздействию на ухо, активируя среднее ухо, а затем барабанную перепонку для получения звука в слуховом проходе. В некоторых вариантах осуществления DPOAE регистрируются на тех же тестовых частотах, которые используются в тестировании ABR (8, 16, 32 кГц), и могут выполняться, пока субъект находится под анестезией для тестирования ABR. В некоторых вариантах осуществления центр f_2 находится на частотах 8, 16 и 32 кГц, тогда как $f_1 = f_2 * 0,8 + 10$ дБ. В некоторых вариантах осуществления на каждой частоте тона представлены в диапазоне от 10 до 80 дБ SPL с возрастающим приращением в 5 дБ. В некоторых вариантах осуществления DPOAE оценивают функцию наружных волосковых клеток и поэтому

обычно используются в качестве сверхпороговой оценки силы ответа, измеряемого как амплитуда ответа эмиссии на частоте продукта искажения. В некоторых вариантах осуществления используются все три тестовые частоты. В некоторых вариантах осуществления надежные ответы на частоте продукта искажения могут быть получены не для каждой тестируемой частоты, в таких случаях может быть выполнен соответствующий анализ. В некоторых вариантах осуществления лечение с помощью технологий, описанных в данном документе, улучшает оценку результатов ВРОАЕ пациентов по сравнению с тестами, проведенными до лечения с использованием технологий, описанных в данном документе, или по сравнению с контрольной популяцией.

Лечение субъекта с целью уменьшения размера опухоли и/или сосудистой сети

[0653] В некоторых вариантах осуществления субъект, страдающий отологическим заболеванием, характеризующимся неоваскуляризацией (например, акустическими невромами, например, ВШ), или подверженный риску его возникновения, может подвергаться анализу функциональности терапии с помощью методов, основанных на визуализации. В некоторых вариантах осуществления эффективность лечения индивидуума композициями и способами, описанными в данном документе, может быть измерена с использованием рентгенографических методов. В некоторых вариантах осуществления такие рентгенографические методы могут включать, помимо прочего, компьютерную томографию (КТ) (также известную как компьютерная аксиальная томография (КАТ)), рентген, магнитно-резонансную томографию (МРТ), трехмерное МРТ-исследование в режиме инверсионного восстановления с подавлением сигнала от жидкости (3D-FLAIR), позитронно-эмиссионную томографию (ПЭТ) и/или сканирование методом ПЭТ-КТ. В данной области техники известны дополнительные подходящие радиографические методики и способы. В некоторых вариантах осуществления лечение с помощью технологий, описанных в данном документе, улучшает оценку субъекта по результатам визуализационных исследований по сравнению с тестами, проведенными до лечения с использованием технологий, описанных в данном документе, или по сравнению с контрольной популяцией.

[0654] В некоторых вариантах осуществления варианты лечения субъекта с применением технологий, описанных в данном документе, ассоциируются с уменьшением размера ВШ, измеренного с помощью радиографического метода. В некоторых вариантах осуществления варианты лечения субъекта с применением технологий, описанных в данном документе, ассоциируются со стазом размера ВШ, измеренного с помощью

радиографического метода. В некоторых вариантах осуществления варианты лечения субъекта с применением технологий, описанных в данном документе, ассоциируются с замедлением роста ВШ, измеренного с помощью радиографического метода.

[0655] В некоторых вариантах осуществления варианты лечения субъекта с применением технологий, описанных в данном документе, ассоциируются со снижением интенсивности сигнала от жидкости на снимках, полученных в ходе трехмерного МРТ-исследования в режиме инверсионного восстановления с подавлением сигнала от жидкости (3D-FLAIR). В определенных вариантах осуществления существует корреляция между более высоким кохлеарным сигналом на изображениях в режиме 3D FLAIR и потерей слуха у пациентов с ВШ. В определенных вариантах осуществления варианты лечения субъекта с применением технологий, описанных в данном документе, позволяют снизить концентрацию белков в перилимфатическом пространстве, связанную с усилением кохлеарного сигнала на изображениях в режиме FLAIR у субъектов с ВШ.

Лечение субъекта для улучшения неврологической функции

[0656] В некоторых вариантах осуществления варианты лечения субъекта с применением технологий, описанных в данном документе, ассоциируются с улучшением неврологической функции. В некоторых вариантах осуществления варианты лечения субъекта с применением технологий, описанных в данном документе, позволяют уменьшить отек опухоли. В некоторых вариантах осуществления варианты лечения субъекта с применением технологий, описанных в данном документе, временно и/или стабильно нормализуют сосудистую сеть опухоли у индивидуума.

[0657] В некоторых вариантах осуществления варианты лечения субъекта с применением технологий, описанных в данном документе, ассоциируются с улучшением и/или восстановлением понимания речи. В некоторых вариантах осуществления варианты лечения субъекта с применением технологий, описанных в данном документе, ассоциируются с воспринимаемым пациентом снижением сложности понимания речи. В некоторых вариантах осуществления варианты лечения субъекта с применением технологий, описанных в данном документе, ассоциируются с улучшением и/или восстановлением заявленного качества жизни индивидуума.

Методы определения характеристик патологического состояния

[0658] Помимо прочего, в настоящем изобретении предложены способы определения характеристик заболевания субъекта, например, субъекта, страдающего от ВШ или подверженного риску развития ВШ. В некоторых вариантах осуществления заболевание

может быть охарактеризовано путем определения наличия (или отсутствия) мутации в гене. Термин «мутация в гене» относится к модификации в известном консенсусном функциональном гене, которая приводит к продукции белка, имеющего одно или более из: делеции одной или более аминокислот, одной или более аминокислотных замен и одной или более аминокислотных вставок по сравнению с консенсусным функциональным белком, и/или приводит к снижению уровня экспрессии кодируемого белка в клетке млекопитающего по сравнению с уровнем экспрессии кодируемого белка в клетке млекопитающего, не имеющей мутации. В некоторых вариантах осуществления мутация может привести к продукции белка, имеющего делецию одной или более аминокислот (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более аминокислот). В некоторых вариантах осуществления мутация может привести к сдвигу рамки считывания в гене. Термин «сдвиг рамки считывания», как известно в данной области техники, охватывает любую мутацию в кодирующей последовательности, которая приводит к сдвигу рамки считывания кодирующей последовательности. В некоторых вариантах осуществления сдвиг рамки считывания может привести к образованию нефункционального белка. В некоторых вариантах осуществления точечная мутация может быть нонсенс-мутацией (например, приводит к преждевременному стоп-кодону в экзоне гена). Нонсенс-мутация может привести к образованию усеченного белка (по сравнению с соответствующим консенсусным функциональным белком), который может быть функциональным или может быть не функциональным. В некоторых вариантах осуществления мутация может приводить к потере (или снижению уровня) экспрессии мРНК или белка, или как мРНК, так и белка. В некоторых вариантах осуществления мутация может привести к образованию измененного белка, имеющего потерю или снижение одной или более биологических активностей (функций) по сравнению с консенсусным функциональным белком.

[0659] В некоторых вариантах осуществления мутация представляет собой вставку одного или более нуклеотидов в ген. В некоторых вариантах осуществления мутация находится в регуляторной и/или контрольной последовательности гена, например, части гена, которая не является кодирующей последовательностью. В некоторых вариантах осуществления мутация в регуляторной и/или контрольной последовательности может находиться в промоторной или энхансерной области и предотвращать или снижать правильную транскрипцию гена. В некоторых вариантах осуществления мутация находится в известном гетерологичном гене, о котором известно, что он взаимодействует с белком.

[0660] Способы генотипирования и/или обнаружения экспрессии или активности мРНК гена и/или белка известны в данной области техники (см., например, Ito et al., World J Otorhinolaryngol. 2013 May 28; 3(2): 26–34, и Roesch et al., Int J Mol Sci. 2018 Jan; 19(1): 209, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки). В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии мРНК или белка может быть определен напрямую (например, обнаружение белка, обнаружение мРНК и т. д.). Неограничивающие примеры методик, которые можно использовать для обнаружения экспрессии и/или активности гена напрямую, включают: ПЦР в реальном времени, вестерн-блоттинг, иммунопреципитацию, иммуногистохимию или иммунофлуоресценцию. В некоторых вариантах осуществления экспрессия гена и/или белка может быть обнаружена опосредовано (например, с помощью функциональных тестов слуха, ABR, DPOAE и т. д.).

[0661] В некоторых вариантах осуществления образцы ткани (например, содержащие одну или более клеток внутреннего уха, например, содержащие одну или более волосковых клеток, и/или одну или более поддерживающих клеток) можно оценивать с помощью морфологического анализа для определения морфологии волосковых клеток и/или поддерживающих клеток до и после введения любых агентов (например, композиций, например, композиций, содержащих конструкции и/или частицы и т. д.), как описано в данном документе. В некоторых таких вариантах осуществления могут быть выполнены стандартные иммуногистохимические или гистологические анализы. В некоторых вариантах осуществления, если клетки используются *in-vitro* или *ex-vivo*, могут быть выполнены дополнительные иммуноцитохимические или иммуногистохимические анализы. В некоторых вариантах осуществления один или более анализов одного или более белков или транскриптов (например, вестерн-блоттинг, ELISA, полимеразная цепная реакция) можно проводить на одном или более образцах субъекта или клеточных популяциях *in vitro*.

Оценка потери слуха, шума в ушах, головокружения и устранение симптомов

[0662] В некоторых вариантах функция слуха определяется у индивидуума путем измерения акустических стволовых вызванных потенциалов (ABR) до, после и/или во время лечения композициями и способами, описанными в данном документе. В некоторых вариантах функция слуха определяется у индивидуума путем измерения отоакустической эмиссии на частоте продукта искажения (DPOAE) до, после и/или во время лечения композициями и способами, описанными в данном документе. В некоторых таких вариантах осуществления измерения проводят на одном или обоих ушах субъекта. В

некоторых таких вариантах осуществления записи сравнивают с предыдущими записями того же субъекта и/или с известными пороговыми значениями таких измерений ответов, используемых для определения, например, потери слуха в сравнении с допустимыми диапазонами слышимости, определяемыми как нормальный слух. В некоторых вариантах осуществления у субъекта регистрируют измерения ABR и/или DPOAE до получения какого-либо лечения. В некоторых вариантах осуществления у субъекта, получающего лечение с применением одной или более технологий, описанных в данном документе, после лечения будут наблюдаться улучшения показателей ABR и/или DPOAE по сравнению с показателями до лечения. В некоторых вариантах осуществления измерения ABR и/или DPOAE проводят после проведения лечения и через регулярные интервалы в рамках последующего наблюдения после лечения.

[0663] В некоторых вариантах осуществления функция слуха определяется с помощью распознавания спектра речевых сигналов или определяется логопедом. В некоторых вариантах осуществления функция слуха определяется тестированием чистого тона. В некоторых вариантах осуществления функцию слуха определяют с помощью тестирования костной проводимости. В некоторых вариантах осуществления функцию слуха определяют с помощью тестирования акустического рефлекса. В некоторых вариантах осуществления функцию слуха определяют с помощью тимпанометрии. В некоторых вариантах осуществления функция слуха определяется любой комбинацией анализов слуха, известной в данной области техники. В некоторых таких вариантах осуществления измерения проводят комплексно и/или на одном или обоих ушах субъекта. В некоторых таких вариантах осуществления записи и/или профессиональный анализ сравнивают с предыдущими записями и/или анализом того же субъекта и/или известными пороговыми значениями таких измерений ответов, используемых для определения, например, потери слуха в сравнении с допустимыми диапазонами слышимости, определяемыми как нормальный слух. В некоторых вариантах осуществления субъекту проводят распознавание спектра речевых сигналов, тестирование чистого тона, тестирование костной проводимости, тестирование акустического рефлекса и/или измерения методом тимпанометрии и/или анализ до получения какого-либо лечения. В некоторых вариантах осуществления у субъекта, получающего лечение с применением одной или более технологий, описанных в данном документе, после лечения будут наблюдаться улучшения в распознавании спектра речевых сигналов, тестировании чистого тона, тестировании костной проводимости, тестировании акустического рефлекса и/или измерениях методом тимпанометрии по сравнению с состоянием до лечения. В некоторых вариантах

осуществления распознавание спектра речевых сигналов, тестирование чистого тона, тестирование костной проводимости, тестирование акустического рефлекса и/или измерения методом тимпанометрии проводят после проведения лечения и через регулярные интервалы в рамках последующего наблюдения после лечения.

[0664] В некоторых вариантах осуществления любой из способов, раскрытых в данном документе, включает оценку поведенческой аудиометрии. В некоторых вариантах осуществления оценка поведенческой аудиометрии включает аудиометрию чистого тона с воздушными и костными кривыми с соответствующей маскировкой, речевую аудиометрию, анализ слов в тишине или на фоне шума. В некоторых вариантах осуществления оценка поведенческой аудиометрии включает электрофизиологическую аудиометрию путем тестирования акустических стволовых вызванных потенциалов. В некоторых вариантах осуществления оценка поведенческой аудиометрии включает стандартизированные опросники: NHIA: опросник нарушений слуха для взрослых, DHI: шкала для оценки головокружения, THI: шкала для оценки головокружения шума в ушах, PANQOL: Пенсильванская шкала оценки качество жизни (QoL) при акустической невроте.

[0665] В некоторых вариантах осуществления любого из раскрытых в данном документе способов безопасность и эффективность можно контролировать посредством оценки отологических, вестибулярных и системных нежелательных явлений, а также результатов гематологических анализов, клинической биохимия крови и/или результатов анализа мочи. В некоторых вариантах осуществления любого из раскрытых в данном документе способов дополнительные параметры, подлежащие оценке, включают уровень анти-VEGF белка в крови и ДНК конструкции в мазках из ушей, мазках из носа, слюне и крови. В некоторых вариантах осуществления любого из раскрытых в данном документе способов также может быть взята кровь для оценки потенциальных гуморальных иммунных ответов на капсид и секретируемый трансгенный продукт.

[0666] Тест ABR измеряет, реагируют ли улитка, улитковый нерв и ствол головного мозга животного на каждый звуковой стимул, и часто используется в качестве меры оценки здоровья уха. Этот же базовый тест обычно используется для проверки слуха новорожденных людей в больницах и является стандартным тестом слуха, используемым для лабораторных животных. В некоторых вариантах осуществления тест ABR включает инъекцию мышам внутрибрюшинной дозы анестетика кетамина/ксилазина, чтобы минимизировать двигательные и мышечные артефакты и облегчить размещение измерительных электродов. В некоторых вариантах осуществления тест ABR (при выполнении с DPOAE одновременно и в обоих ушах) занимает приблизительно 45 минут,

поэтому иногда требуется бустерная доза анестетика. В некоторых вариантах осуществления начальная доза анестетика состоит из кетамина (100 мг/кг) и ксилазина (10 мг/кг) внутривентриально и, при необходимости, бустерной дозы только кетамина, которая состоит из $\frac{1}{4}$ - $\frac{1}{2}$ исходной дозы кетамина. В некоторых вариантах осуществления повторное введение ксилазина не выполняется на основании рекомендаций ветеринара. В некоторых вариантах осуществления трансдермальные регистрирующие электроды через поверхность кожи размещают в трех стандартных местах (на макушке черепа на равном расстоянии между ушами, над сосцевидным отростком за ушной раковиной на исследуемом ухе и над сосцевидным отростком позади ушной раковины для противоположного уха для заземляющего электрода). В некоторых вариантах осуществления стимулы состоят из низкочастотных (8 кГц), средних (16 кГц) и высокочастотных (32 кГц) стимулов чистого тона (нарастание и падение на 0,1 мс, продолжительность 1,5 мс) от 10 до 80 дБ SPL с шагом 5 дБ в сторону увеличения. В некоторых вариантах осуществления стимулы будут подаваться со скоростью 30 импульсов в секунду, и на каждом уровне стимула будет получено 512 средних значений без артефактов. В некоторых вариантах осуществления ABR регистрировали в 2-3 отдельных момента времени, в зависимости от группы; на исходном уровне и на заключительной неделе 4-6, при этом часть животных также тестировали на 3-й неделе после операции. В некоторых вариантах осуществления в дополнение к измерению самой низкой интенсивности каждой частоты стимула, которую ствол головного мозга животного может надежно обработать (порог), можно измерить амплитуду волны I в ответ на надпороговые стимулы, чтобы оценить целостность афферентного потока информация от волосковых клеток улитки к слуховому нерву. В некоторых вариантах осуществления пороги ABR могут предоставлять важную информацию о самом низком уровне звука, который проходит через ухо животного и обрабатывается стволом головного мозга. Надпороговые ответы в амплитуде волны I ABR все чаще используются в качестве показателя целостности связи ленточного синапса между основанием внутренних волосковых клеток и дендритами слухового нерва.

[0667] DPOAE — это звуки, создаваемые движением наружных волосковых клеток улитки, которые измеряются неинвазивно в ушном канале с помощью комбинации преобразователя и микрофона. В некоторых вариантах осуществления размер вызванных DPOAE является полезной мерой функции наружных волосковых клеток. Этот же базовый тест также обычно используется для проверки слуха новорожденных людей в больницах и является стандартным тестом слуха, используемым для лабораторных животных. В некоторых вариантах осуществления в ухо подаются два основных тона (f_1 и f_2),

вызывающие механические вибрации, которые вызывают изменения давления в улитковых жидкостях на частоте стимула и искажения. В некоторых вариантах осуществления эти изменения давления приводят к обратному воздействию на ухо, активируя среднее ухо, а затем барабанную перепонку для получения звука в слуховом проходе. В некоторых вариантах осуществления DPOAE регистрируют на тех же исследуемых частотах, которые используются в тесте ABR (8, 16, 32 кГц), и под действием анестезии в случае ABR. В некоторых вариантах осуществления центр f_2 находится на частотах 8, 16 и 32 кГц, тогда как $f_1 = f_2 * 0,8 + 10$ дБ. В некоторых вариантах осуществления на каждой частоте тоны представлены в диапазоне от 10 до 80 дБ SPL с возрастающим приращением в 5 дБ. В некоторых вариантах осуществления DPOAE оценивают функцию наружных волосковых клеток и поэтому обычно используются в качестве сверхпороговой оценки силы ответа, измеряемого как амплитуда ответа эмиссии на частоте продукта искажения. В некоторых вариантах осуществления используются все три тестовые частоты. В некоторых вариантах осуществления надежные ответы на частоте продукта искажения могут быть получены не для каждой тестируемой частоты, в таких случаях может быть выполнен соответствующий анализ.

Оценка размера опухоли и сосудистой сети

[0668] В некоторых вариантах осуществления эффективность лечения индивидуума композициями и способами, описанными в данном документе, может быть измерена с использованием рентгенографических методов. В некоторых вариантах осуществления такие рентгенографические методы могут включать компьютерную томографию (КТ) (также известную как компьютерная аксиальная томография (КАТ)), рентген, магнитно-резонансную томографию (МРТ), трехмерное МРТ-исследование в режиме инверсионного восстановления с подавлением сигнала от жидкости (3D-FLAIR), позитронно-эмиссионную томографию (ПЭТ) и/или сканирование методом ПЭТ-КТ. Дополнительные радиографические методы и способы, которые могут быть подходящими, также известны в данной области техники.

[0669] В некоторых вариантах осуществления лечение индивидуума способами и/или композициями, описанными в данном документе, ассоциируется с уменьшением размера ВШ, измеренного с помощью радиографического метода. В некоторых вариантах осуществления лечение индивидуума способами и/или композициями, описанными в данном документе, ассоциируется с стабом размера ВШ, измеренного с помощью радиографического метода. В некоторых вариантах осуществления лечение индивидуума способами и/или композициями, описанными в данном документе, ассоциируется с

замедлением роста ВШ, измеренного с помощью радиографического метода.

[0670] В некоторых вариантах осуществления лечение индивидуума способами и/или композициями, описанными в настоящем документе, ассоциируется со снижением интенсивности от сигнала на снимках, полученных в ходе трехмерного МРТ-исследования в режиме инверсионного восстановления с подавлением сигнала от жидкости (3D-FLAIR). В определенных вариантах осуществления существует корреляция между более высоким кохлеарным сигналом на изображениях в режиме 3D FLAIR и потерей слуха у пациентов с ВШ. В некоторых вариантах осуществления способы и/или композиции, описанные в данном документе, позволяют снизить концентрацию белков в перилимфатическом пространстве, связанную с усилением кохлеарного сигнала на изображениях в режиме FLAIR у субъектов с ВШ.

Оценка неврологической функции

[0671] В некоторых вариантах осуществления лечение индивидуума способами и/или композициями, описанными в данном документе, ассоциируется с улучшением неврологической функции. В некоторых вариантах осуществления лечение индивидуума способами и/или композициями уменьшает отек опухоли. В некоторых вариантах осуществления лечение индивидуума способами и/или композициями приводит к временной и/или стабильной нормализации сосудистой сети опухоли у индивидуума.

[0672] В некоторых вариантах осуществления лечение индивидуума способами и/или композициями, описанными в данном документе, ассоциируется с улучшением и/или восстановлением понимания речи. В некоторых вариантах осуществления лечение индивидуума способами и/или композициями, описанными в данном документе, ассоциируется с воспринимаемым пациентом снижением сложности понимания речи. В некоторых вариантах осуществления лечение индивидуума способами и/или композициями, описанными в данном документе, ассоциируются с улучшением и/или восстановлением заявленного качества жизни индивидуума.

Оценка концентрации анти-VEGF белка в биологических образцах

[0673] В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в данном документе, включают оценку концентраций анти-VEGF белка в одном или более биологических образцах, взятых у индивидуума до, во время и/или после лечения композициями, описанными в данном документе.

[0674] В некоторых вариантах осуществления этих способов после лечения, например,

одного, двух или более введений композиций, описанных в данном документе, происходит увеличение экспрессии анти-VEGF белка. В некоторых вариантах осуществления увеличение экспрессии активного анти-VEGF белка, как описано в данном документе при сравнении относительно контрольного уровня, например, при сравнении с уровнем экспрессии анти-VEGF белка до введения композиций, содержащих любую(-ые) конструкцию(-и), как описано в данном документе.

[0675] Способы определения экспрессии и/или активности РНК-мишени и/или белка известны в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии белка-мишени клетки внутреннего уха можно определять напрямую (например, путем определения белка-мишени клетки внутреннего уха или мРНК-мишени). Неограничивающие примеры способов, которые можно использовать для непосредственного обнаружения экспрессии и/или активности РНК-мишени или белка, включают: ПЦР в реальном времени, вестерн-блоттинг, иммунопреципитацию, иммуногистохимию, масс-спектрометрию или иммунофлуоресценцию. В некоторых вариантах осуществления экспрессия белка-мишени клетки внутреннего уха может быть обнаружена опосредовано (например, с помощью функциональных тестов слуха).

[0676] В некоторых вариантах осуществления проводят анализ биораспределения и/или выделения частиц гAAV. В некоторых вариантах осуществления в данном документе раскрыта композиция, содержащая дефектную по репликации гAAV-анти-VEGF частицу гAAV для доставки кДНК, например, для экспрессии анти-VEGF белка. В некоторых вариантах осуществления частица гAAV, как описано в данном документе, используется для лечения субъекта, например, человека, например, пациента, с ВШ или риском развития ВШ. В некоторых вариантах осуществления композицию, описанную в данном документе, вводят посредством внутрикохлеарного пути введения. В некоторых вариантах осуществления композицию, раскрытую в данном документе, вводят в дозе частиц гAAV, описанных в данном документе (например, по результатам анализа кПЦР векторного генома). В некоторых вариантах осуществления раскрытую в данном документе композицию вводят в локализованный участок тела. В некоторых вариантах осуществления композиция, раскрытая в данном документе, приводит к обнаруживаемой экспрессии последовательностей конструкции в локализованной области тела, например, в улитке и/или перилимфе. В некоторых вариантах осуществления ожидается, что композиция, раскрытая в данном документе, приведет к ограниченному распространению по сосудам и системному воздействию. В некоторых вариантах осуществления композиция, раскрытая в данном документе, приводит к повышению уровня последовательностей конструкции в

улитке, но не в тканях или жидкостных компартментах, не относящихся к улитке, например, в печени, селезенке, лимфатических узлах, стволе мозга, слуховой зоне коры головного мозга, сыворотке и/или СМЖ. В некоторых вариантах осуществления композиция, раскрытая в данном документе, приводит к более низким, но поддающимся обнаружению уровням последовательностей конструкций в собранных некохлеарных тканях и жидкостях. В некоторых вариантах осуществления экспрессия последовательностей конструкции в некохлеарной ткани находится на уровне, который не является терапевтически значимым. В некоторых вариантах осуществления уровни последовательностей конструкций в целом снизились через шесть месяцев. В некоторых вариантах осуществления уровни последовательностей конструкций снижаются с течением времени в образцах крови, например, через один месяц после внутрикохлеарного введения композиции, раскрытой в данном документе.

[0677] В некоторых вариантах осуществления любого из способов, раскрытых в данном документе, собирают и/или оценивают соответствующие жидкости на предмет биораспределения и выделения (например, кровь, сыворотку, мочу, слюну, мазки из носа и ушей и СМЖ). В некоторых вариантах осуществления любого из раскрытых в данном документе способов собирают и/или оценивают ткани, не являющиеся мишенями. В некоторых вариантах осуществления ожидается, что вариант капсида будет определять тропизм. В некоторых вариантах осуществления композиция, раскрытая в данном документе, содержит вариант капсида, например, вариант капсида AAVAnc80. В некоторых вариантах осуществления доставка раскрытой в данном документе композиции, содержащей вариант капсида, например, посредством того же пути введения, в том же составе частиц и/или при эквивалентных или более низких дозах частиц, не приведет к различиям в биораспределении и характере выделения.

[0678] В некоторых вариантах осуществления композицию, описанную в данном документе, например, гAAV-анти-VEGF, вводят на уровне менее, чем около 5×10^{12} общего вг/улитку. В некоторых вариантах осуществления композицию, описанную в данном документе, например, гAAV-анти-VEGF, вводят на уровне менее, чем около 5×10^{13} вг/мл. В некоторых вариантах осуществления доза композиции, раскрытой в данном документе, зависит, например, от ограничений объема и концентрации частиц гAAV.

[0679] Напротив, в клинических испытаниях с использованием частиц гAAV было доставлено более 1×10^{14} вг/кг через системные пути введения, в некоторых случаях у участников младше 6 месяцев (AveXis 2019, полностью включена в данный документ посредством ссылки).

[0680] Другие локальные доставки с относительно низкими дозами частиц гAAV не сообщали об обширном биораспределении за пределами области-мишени, например, по всему телу, или об обширном выделении частиц гAAV (выведение/секреция; обычно измерение концентрации базовой ДНК конструкции с помощью таких методов, как кПЦР). Например, сообщалось о низком уровне распределения за пределами целевой области глаза (в частности, в зрительном нерве глаза, в который были введены частицы, перекресте зрительных нервов, селезенке и печени, а также спорадически в лимфатических узлах исследуемых животных) в случае двустороннего введения препарата Лукстурна® в дозе $7,5 \times 10^{11}$ вг/глаз. Аналогичным образом, в клиническом испытании фазы 3 частицы гAAV выделялись кратковременно и в небольших количествах со слезами у 45% участников; они также были обнаружены на низких уровнях в образцах сыворотки (но не были обнаружены в цельной крови) 10% участников в дни сразу после субретинального введения препарата Лукстурна®, доставляемого билатерально в дозе $1,5 \times 10^{11}$ вг/глаз (Russell 2017; Spark Therapeutics 2017, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки).

[0681] В некоторых вариантах осуществления любой из способов, раскрытых в данном документе, включает оценку распределения последовательностей частиц гAAV в крови (например, сыворотке и цельной крови) с течением времени после одностороннего введения в улитку с использованием, например, валидованного метода кПЦР. В некоторых вариантах осуществления для оценки выделения у субъекта будут собираться дополнительные образцы (например, мазки из наружного слухового прохода, мазки из носа, слюна и моча). В некоторых вариантах осуществления образец берут у субъекта до тех пор, пока не будут получены по меньшей мере три последовательных отрицательных образца.

[0682] В некоторых вариантах осуществления белки, коррелирующие с ВШ, измеряют до, во время и/или после лечения композициями и/или способами, описанными в данном документе. В определенных вариантах осуществления такие белки, ассоциированные с ВШ потерей слуха, включают: μ -кристаллин (CRYM), белок 2, родственник рецептору липопротеинов низкой плотности (LRP2), С-область γ -4-цепи иммуноглобулина (Ig), С-область к-цепи Ig, комплемент С3, константный домен 3 тяжелой γ -цепи иммуноглобулина и/или хемокиновый рецептор-4 (CXCR4).

[0683] В некоторых вариантах осуществления измеряют иммуногенность по отношению к капсидам и/или частицам AAV. Иммуногенность капсидов и/или частиц AAV, доставленных в локализованные области, и в относительно низких дозах по сравнению с системными применениями, как правило, не приводила к специфическим

паттернам иммунных ответов; важно отметить, что ответы, наблюдаемые с помощью как гуморального, так и клеточно-опосредованного иммунологического мониторинга (например, с помощью твердофазного иммуноферментного анализа [ELISA]/анализа нейтрализующих антител [NAb] и точечного иммуноферментного анализа [ELISPOT], соответственно), преимущественно не имели клинической корреляции в отношении путей введения (ROA), которые обеспечивают некоторую иммунологическую защиту (например, прямое введение в головной мозг).

[0684] Ожидается, что в некоторых вариантах осуществления любого из способов, раскрытых в данном документе, внутрикохлеарный ROA, например, у видов с несостоятельным водопроводом улитки (например, у NHP и человека), будет обеспечивать аналогичный уровень защиты. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, раскрытых в данном документе, субъект будет получать короткий периоперационный курс иммуномодулирующего режима, например, системных пероральных кортикостероидов, в течение приблизительно 17 дней, начиная за 3 дня до введения композиций, раскрытых в данном документе, например, rAAV-анти-VEGF. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий режим уменьшает воспаление, связанное с процедурой хирургического введения. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующая схема также может дополнительно снижать вероятность иммунной реакции либо на капсид (например, AAVAnc80), либо на основную конструкцию (например, трансгенный продукт, например, анти-VEGF белок).

[0685] В некоторых вариантах осуществления любой способ, раскрытый в данном документе, дополнительно включает оценку гуморального иммунитета (например, ответов антител) в ответ на введение композиции, раскрытой в данном документе. В некоторых вариантах осуществления оценивается влияние ранее существовавшего иммунитета, определенного, например, по уровням NAb в сыворотке, на трансдукцию композиций, раскрытых в данном документе, при доставке посредством внутрикохлеарного ROA. В некоторых вариантах осуществления ранее имевшиеся уровни NAb не ингибируют трансдукцию частиц AAV, доставляемых внутрикохлеарным путем введения. В некоторых вариантах осуществления любой способ, раскрытый в данном документе, дополнительно включает оценку сыворотки на предмет наличия потенциальных системных гуморальных ответов как на капсид AAV, так и/или на трансгенный продукт (например, секретируемый белок). В некоторых вариантах осуществления, в зависимости от оценки системных гуморальных ответов, может быть разработан интервал лечения для двустороннего внутрикохлеарного введения композиции, раскрытой в данном документе, например,

гAAV-анти-VEGF.

[0686] В некоторых вариантах осуществления любой способ, раскрытый в данном документе, не приводит к цитотоксическим Т-клеточным ответам, например, на частицу AAV, капсид и/или продукт конструкции (например, базового трансгена) из частиц гAAV, доставляемых через локализованный путь введения (ROA), например, внутриглазное введение. Например, в маркировке Лукстурна® указано, что ни у одного субъекта не было клинически значимого ответа цитотоксических Т-клеток (Spark Therapeutics 2017, полностью включена в данный документ посредством ссылки); отдельные положительные результаты анализа ELISPOT на интерферон-гамма (IFN-gamma) были получены в ходе программы клинических исследований (см., например, Bennett 2012, полностью включена в данный документ посредством ссылки), но значимость этих изолированных результатов неизвестна, поскольку клинической воспалительной реакции не наблюдалось и в клинической программе не наблюдалось дозолимитирующей токсичности.

[0687] В некоторых вариантах осуществления измеряют и собирают данные по фармакокинетике любой из композиций или продуктов композиций, описанных в данном документе. В определенных вариантах осуществления секретируется анти-VEGF белок; в предшествующем уровне техники описаны высокие дозы системного анти-VEGF белка, которые ассоциируются с гипертонией, протеинурией, повышением уровня печеночных ферментов, артериальными тромбоэмболическими явлениями, венозными тромбоэмболическими явлениями, кровотечениями, осложнениями, связанными с хирургическим вмешательством и заживлением ран, при системном введении высоких доз в течение длительного периода времени (от 5 до 15 мг/кг каждые 2-3 недели). В некоторых вариантах осуществления любого из раскрытых в данном документе способов композицию, раскрытую в данном документе, применяют местно. В некоторых вариантах осуществления местная доставка композиции, раскрытой в настоящем документе, приводит к снижению вероятности возникновения одного или более негативных эффектов нецелевого воздействия. В некоторых вариантах осуществления местная доставка композиции, раскрытой в данном документе, не приводит к каким-либо негативным эффектам нецелевого воздействия. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, раскрытых в данном документе, за субъектом осуществляют наблюдение путем мониторинга анти-VEGF белка в сыворотке (например, с помощью электрохемилюминесцентного анализа), определения показателей жизненно важных функций, анализа мочи и/или клинического биохимического анализа. В некоторых вариантах осуществления наблюдение за субъектом, которому вводится композиция,

раскрытая в настоящем документе, позволяет осуществлять своевременное вмешательство и/или минимизировать любые эффекты нецелевого воздействия.

[0688] В некоторых вариантах осуществления после введения композиции, описанной в данном документе, может быть собрана сыворотка и проанализирована для измерения уровня анти-VEGF белка. В некоторых вариантах осуществления такие измерения могут проводиться до введения композиции (исходный уровень), на неделе 2 после введения, и ежемесячно в течение соответствующего периода времени (например, 3 месяцев, 6 месяцев, 1 года, 2 лет, 3 лет, 4 лет или более 5 лет). В некоторых вариантах осуществления анти-VEGF белок не будет обнаруживаться в сыворотке индивидуума на исходном уровне или в любой момент времени после введения у индивидуумов, которые получили внутрикохлеарную доставку либо несущей среды, либо низкой дозы частиц гAAV-анти-VEGF, описанных в данном документе.

[0689] В некоторых вариантах осуществления любого способа, раскрытого в данном документе, способ включает сбор и/или оценку образцов сыворотки на наличие анти-VEGF белка с помощью (например, электрохемилюминесцентного анализа, как описано в данном документе).

Способы получения

[0690] Системы AAV, как правило, хорошо известны в данной области техники (см., например, Kelleher and Vos, *Biotechniques*, 17(6):1110-17 (1994); Cotten et al., *P.N.A.S. U.S.A.*, 89(13):6094-98 (1992); Curiel, *Nat Immun*, 13(2-3):141-64 (1994); Muzyczka, *Curr Top Microbiol Immunol*, 158:97-129 (1992); и Asokan A, et al., *Mol. Ther.*, 20(4):699-708 (2012), каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки). Способы получения и использования конструкций AAV описаны, например, в патентах США № 5 139 941, 4 797 368 и заявке на подачу PCT US 2019/060328, каждый или каждая из которых полностью включены в данный документ посредством ссылки.

[0691] Способы получения вирусных конструкций известны в данной области техники. Например, для получения конструкций AAV способы обычно включают культивирование клетки-хозяина, которая содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую капсидный белок AAV или его фрагмент; функциональный ген гер; рекомбинантную конструкцию AAV, состоящую из инвертированных концевых повторов (ITR) AAV и кодирующей последовательности; и/или достаточные хелперные функции, позволяющие упаковывать рекомбинантную конструкцию AAV в капсидные белки AAV.

[0692] В некоторых вариантах осуществления компоненты, подлежащие

культивированию в клетке-хозяине для упаковки конструкции AAV в капсиде AAV могут быть доставлены в клетку-хозяина в виде транс-факторов (in trans). В качестве альтернативы, любой один или более компонентов (например, рекомбинантная конструкция AAV, последовательности гер, последовательности сар и/или хелперные функциональные элементы) могут быть обеспечены стабильной клеткой-хозяином, которая была сконструирована в возможностью содержать один или более компонентов, с использованием способов, известных специалистам в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления такая стабильная клетка-хозяин содержит такой(-ие) компонент(-ы) под контролем индуцибельного промотора. В некоторых вариантах осуществления такой(-ие) компонент(-ы) может(могут) находиться под контролем конститутивного промотора. В некоторых вариантах осуществления выбранная стабильная клетка-хозяин может содержать выбранный(-ые) компонент(-ы) под контролем конститутивного промотора и другой выбранный(-ые) компонент(-ы) под контролем одного или более индуцибельных промоторов. Например, может быть получена стабильная клетка-хозяин, которая происходит из клеток HEK293 (которые содержат хелперные функциональные элементы E1 под контролем конститутивного промотора), но которые содержат белки гер и/или сар под контролем индуцибельных промоторов. Другие стабильные клетки-хозяева могут быть созданы специалистом в данной области техники с помощью обычных методов.

[0693] Рекомбинантная конструкция AAV, последовательности гер, последовательности сар и хелперные функциональные элементы, необходимые для продуцирования AAV по данному изобретению, могут быть доставлены в упаковывающую клетку-хозяин с использованием любого подходящего генетического элемента (конструкции). Выбранный генетический элемент может быть доставлен любым подходящим способом, известным в данной области техники, например, специалистам в области манипуляций с нуклеиновыми кислотами, и включает генную инженерию, рекомбинантную инженерию и синтетические методы (см., например, Sambrook et al, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y., которая полностью включена в данный документ посредством ссылки). Точно так же хорошо известны способы получения частиц AAV, и любой подходящий способ можно использовать с настоящим изобретением (см., например, K. Fisher et al, *J. Virol.*, 70:520-532 (1993) и патент США № 5 478 745, которые полностью включены в данный документ посредством ссылки).

[0694] В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные AAV могут быть

получены с использованием метода тройной трансфекции (например, как описано в патенте США № 6 001 650, который полностью включен в данный документ посредством ссылки). В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные AAV получают путем трансфекции клетки-хозяина рекомбинантной конструкцией AAV (содержащей кодирующую последовательность), подлежащей упаковке в частицы AAV, конструкцией, обеспечивающей хелперную функцию для AAV, и конструкцией, обеспечивающей вспомогательную функцию. Конструкция, обеспечивающая хелперную функцию для AAV, кодирует последовательности, обеспечивающие «хелперную функцию для AAV» (например, гер и сар), которые функционируют *in trans* для продуктивной репликации и инкапсулирования AAV. В некоторых вариантах осуществления хелперная функциональная конструкция AAV поддерживает эффективное продуцирование конструкции AAV без образования каких-либо детектируемых частиц AAV дикого типа (например, частиц AAV, содержащих функциональные гены гер и сар). Неограничивающие примеры конструкций, подходящих для применения в настоящем раскрытии, включают rHLP19 (см., например, патент США № 6 001 650, который полностью включен в данный документ посредством ссылки) и конструкцию rRepсarb (см., например, патент США № 6 156 303, который полностью включен в данный документ посредством ссылки). Вспомогательная функциональная конструкция кодирует нуклеотидные последовательности для вирусных и/или клеточных функций, не являющихся производными AAV, от которых зависит репликация AAV (например, «вспомогательные функциональные элементы»). Вспомогательные функции могут включать те функции, которые необходимы для репликации AAV, включая, без ограничения, те части, которые участвуют в активации транскрипции гена AAV, стадийно-специфическом сплайсинге мРНК AAV, репликации ДНК AAV, синтезе продуктов экспрессии кэпа и сборке капсида AAV. Вирусные вспомогательные функциональные элементы могут быть приобретены из любого из известных хелперных вирусов, таких как аденовирус, вирус герпеса (кроме вируса простого герпеса типа 1) и вирус осповакцины.

[0695] Дополнительные способы создания и выделения вирусных конструкций AAV, пригодных для доставки субъекту, описаны, например, в патенте США № 7 790 449; патенте США № 7 282 199; WO 2003/042397; WO 2005/033321, WO 2006/110689; и патенте США № 7 588 772, каждый из которых полностью включен в данный документ посредством ссылки. В одной системе клеточную линию-продуцент временно трансфицируют конструкцией, которая кодирует кодирующую последовательность, фланкированную ITR, и конструкцией(-ями), которая(-ые) кодирует(-ют) гер и сар. В

другой системе пакующую линию клеток, которая стабильно поставляет гер и сар, временно трансфицируют конструкцией, которая кодирует кодирующую последовательность, фланкируемую ITR. В каждой из этих систем частицы AAV вырабатываются в ответ на инфекцию хелперным аденовирусом или вирусом герпеса, AAV отделяются от контаминирующего вируса. Другие системы, которые не требуют инфицирования хелперным вирусом для восстановления AAV — хелперные функциональные элементы (например, аденовирус E1, E2a, VA и E4 или вирус герпеса UL5, UL8, UL52 и UL29, а также полимераза вируса герпеса) также поставляются системой в виде транс-факторов. В таких системах хелперные функциональные элементы могут поставляться путем временной трансфекции клеток конструкциями, которые кодируют хелперные функции, или клетки могут быть искусственно сконструированы с возможностью стабильно содержать гены, кодирующие хелперные функции, экспрессию которых можно контролировать на транскрипционном или посттранскрипционном уровне.

[0696] В некоторых вариантах осуществления определяют титры вирусных конструкций после очистки. В некоторых вариантах осуществления титр определяют с помощью количественной ПЦР. В определенных вариантах осуществления для определения уровня конструкции используют зонд TaqMan, специфичный для конструкции. В определенных вариантах осуществления зонд TaqMan представлен SEQ ID NO: 97, а праймеры для прямой и обратной амплификации представлены SEQ ID NO: 98 и 99, соответственно.

[0697] Иллюстративный зонд TaqMan для количественного определения конструкций (SEQ ID NO: 97)

/56-FAM/TAATTCCAA/ZEN/CCAGCAGAGTCAGGGC/3IABkFQ/

[0698] Иллюстративный праймер для прямой кПЦР для количественного определения конструкций (SEQ ID NO: 98)

GATACAGCTAGAGTCCTGATTGC

[0699] Иллюстративный праймер для обратной кПЦР для количественного определения конструкций (SEQ ID NO: 99)

GATCTGCCAAGTACCTCACTATG

[0700] Как описано в данном документе, в некоторых вариантах осуществления вирусная конструкция по настоящему изобретению представляет собой конструкцию аденоассоциированного вируса (AAV). Было охарактеризовано несколько серотипов AAV,

включая AAV1, AAV2, AAV3 (например, AAV3B), AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11 и AAV Anc80, а также их варианты. В некоторых вариантах осуществления частица AAV представляет собой частицу AAV2/6, AAV2/8, AAV2/9 или AAV2/Anc80 (например, с капсидом AAV6, AAV8, AAV9 или Anc80 и конструкцией с ITR AAV2). Другие частицы и конструкции AAV описаны, например, в Sharma et al., Brain Res Bull. 2010 Feb 15; 81(2-3): 273, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки. Как правило, для доставки описанной в данном документе кодирующей последовательности можно использовать любую частицу AAV. Однако серотипы имеют разные тропизмы, например, они преимущественно инфицируют разные ткани. В некоторых вариантах осуществления конструкция AAV представляет собой самокомплементарную конструкцию AAV.

[0701] В настоящем изобретении предложены, среди прочего, способы изготовления конструкций на основе AAV. В некоторых вариантах осуществления такие способы включают использование клеток-хозяев. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего. Клетка-хозяин может использоваться в качестве реципиента хелперной конструкции AAV, минигенной плазмиды AAV, вспомогательной функциональной конструкции и/или другого ДНК-переносчика, связанного с продуцированием рекомбинантных AAV. Термин включает потомство исходной клетки, которая была трансфицирована. Таким образом, используемый в данном документе термин «клетка-хозяин» может относиться к клетке, которая была трансфицирована экзогенной последовательностью ДНК. Понятно, что потомство одной родительской клетки не обязательно может быть полностью идентичным по морфологии или по комплементарной последовательности геномной или общей ДНК с исходной родительской клеткой вследствие природных, случайных или умышленных мутаций.

[0702] Дополнительные способы получения и выделения частиц AAV, пригодных для доставки субъекту, описаны, например, в патенте США № 7 790 449; патенте США № 7 282 199; WO 2003/042397; WO 2005/033321, WO 2006/110689; и патенте США № 7 588 772, каждый из которых полностью включен в данный документ посредством ссылки. В одной системе клеточную линию-продуцент временно трансфицируют конструкцией, которая кодирует кодирующую последовательность, фланкированную ITR, и конструкцией(-ями), которая(-ые) кодирует(-ют) гер и сар. В другой системе пакующую линию клеток, которая стабильно поставяет гер и сар, временно трансфицируют конструкцией, которая кодирует кодирующую последовательность, фланкируемую ITR. В каждой из этих систем частицы AAV вырабатываются в ответ на инфекцию хелперным

аденовирусом или вирусом герпеса, частицы AAV отделяются от контаминирующего вируса. Другие системы, которые не требуют инфицирования хелперным вирусом для восстановления частиц AAV — хелперные функциональные элементы (например аденовирус E1, E2a, VA и E4 или вирус герпеса UL5, UL8, UL52 и UL29, а также полимеразы вируса герпеса) также поставляются системой в виде транс-факторов. В таких системах хелперные функциональные элементы могут поставляться путем временной трансфекции клеток конструкциями, которые кодируют хелперные функции, или клетки могут быть искусственно сконструированы с возможностью стабильно содержать гены, кодирующие хелперные функции, экспрессию которых можно контролировать на транскрипционном или посттранскрипционном уровне.

[0703] В еще одной системе кодирующая последовательность, фланкированная ITR, и гены гер/сар вводятся в клетки-хозяева насекомых путем инфицирования конструкциями на основе бакуловируса. Такие системы продукции известны в данной области техники (см. в целом, например, Zhang et al., 2009, Human Gene Therapy 20:922-929, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки). Способы получения и использования этих и других систем продукции AAV также описаны в патентах США № 5 139 941; 5 741 683; 6 057 152; 6 204 059; 6 268 213; 6 491 907; 6 660 514; 6 951 753; 7 094 604; 7 172 893; 7 201 898; 7 229 823; и 7 439 065, каждый из которых полностью включен в данный документ посредством ссылки.

[0704] В некоторых вариантах осуществления любого из способов, раскрытых в данном документе, для композиции, раскрытой в данном документе, используется целенаправленный набор аналитических тестов и более короткий протокол испытаний стабильности, например, для гAAV-анти-VEGF, например, лекарственного вещества (DS) AAV-анти-VEGF. В некоторых вариантах осуществления DS и лекарственный продукт (DP) для композиции, раскрытой в данном документе, например, гAAV-анти-VEGF, очень похожи, например, отличаются только дополнительной стадией фильтрации и наполнения флаконов, представляющими собой производство DP из DS. В некоторых вариантах осуществления DP подвергается более комплексному аналитическому тестированию и более длительному протоколу тестирования стабильности. В некоторых вариантах осуществления DS не хранится в течение длительного времени, например, DS оперативно переводят с производства DS на производство DP. В некоторых вариантах осуществления DS хранят, например, при температуре ≤ -65 °C до процесса наполнения/конечной обработки.

[0705] В некоторых вариантах осуществления любого из способов, раскрытых в данном

документе, стабильность композиции, раскрытой в данном документе, например, DS и DP rAAV-анти-VEGF, оценивают с использованием анализов, которые, например, указывают на стабильность продукта, включая внешний вид, титр генома вектора (кцПЦР), активность и/или бионагрузку (DS) или стерильность (DP). В некоторых вариантах осуществления анализ эффективности включает спецификацию после того, как будет получено достаточно данных для подтверждения установления спецификации. В некоторых вариантах осуществления DS и DP будут подвергаться исследованию стабильности при 2-8 °С в течение около 6 недель. В некоторых вариантах осуществления DS не хранят при температуре 2-8°С в течение продолжительных периодов времени. В некоторых вариантах осуществления DP хранится в течение 60 месяцев при заданной температуре хранения (≤ -65 °С). В некоторых вариантах осуществления DS хранят, например, подвергают исследованию стабильности в течение около 12 месяцев.

[0706] В некоторых вариантах осуществления активность и эффективность композиции, раскрытой в настоящем документе, например, rAAV-анти-VEGF, оценивают с помощью анализа, например, матрицы анализов, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления анализы включают оценку нескольких характеристик продукта и будут использоваться для оценки функциональной активности продукта, консистенции, стабильности и/или для предоставления доказательств сопоставимости после внесения любых изменений в производственный процесс. В некоторых вариантах осуществления анализ титров методом кцПЦР проверяют на пригодность перед введением композиции, раскрытой в данном документе, субъекту. В некоторых вариантах осуществления экспрессию анти-VEGF белка оценивают в клеточной линии млекопитающих *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления экспрессию белка оценивают по нескольким показателям множественности заражения (MOI) и сравнивают с эталонным стандартом. В некоторых вариантах осуществления функциональный биоанализ используется в способе, раскрытом в настоящем документе, например, включая коммерчески доступные наборы и опубликованные способы определения анти-VEGF активности. В некоторых вариантах осуществления используется функциональный биоанализ, который оценивает эффективность, например, чувствительная и количественная мера биологической активности экспрессированного анти-VEGF белка.

[0707] В некоторых вариантах осуществления используется раскрытый в данном документе способ производства. В некоторых вариантах осуществления ожидается, что способ производства не повлияет на качественные характеристики частицы rAAV или не повлияет на интерпретацию соответствующих исследований.

[0708] В некоторых вариантах осуществления композиция, описанная в данном документе, содержит рекомбинантную частицу, например, гAAV-антиVEGF, которая содержит два компонента, например, капсид AAVAnc80 (Zinn 2015, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки) и геном одноцепочечной ДНК из 3555 нуклеотидов, за исключением последовательностей инвертированных концевых повторов (ITR) (пример конструкции, представленной на **фиг. 6, панель (А)** и представленной SEQ ID NO: 92), инкапсулированных капсидом AAVAnc80. В некоторых вариантах осуществления композиция, раскрытая в данном документе, например, частица гAAV-анти-VEGF, экспрессирует ранибизумаб, гуманизированный моноклональный Fab с молекулярной массой 48 кДа (полученный из полноразмерного мышинового моноклонального антитела к VEGF человека А.4.6.1), который используется, например, в клинических условиях для ингибирования VEGF.

ПРИМЕРЫ

[0709] Далее будет подробно описано изобретение со ссылкой на следующие экспериментальные примеры. Эти примеры предоставлены только в целях иллюстрации, и их не следует интерпретировать как ограничивающие, если не указано иное. Таким образом, изобретение не должно восприниматься как такое, которое ограничивается следующими примерами, оно должно восприниматься скорее как такое, которое охватывает любые и все варианты, которые станут очевидными в результате идей, представленных в данном документе.

[0710] Считается, что специалист в данной области техники сможет, используя предшествующее описание и следующие примеры, а также то, что известно в данной области техники, создать и использовать технологии по настоящему раскрытию.

Пример 1. Конструирование вирусных конструкций

[0711] В данном примере представлено описание создания иллюстративных вирусных конструкций, кодирующих анти-VEGF белок, как описано в данном документе. Специалистам в данной области техники будет понятно, что подобные конструкции могут быть получены в соответствии с этим примером. Например, могут быть созданы конструкции гAAV, которые экспрессируют анти-VEGF белки млекопитающих, приматов или человека в рамках стратегий с применением одной, двух или нескольких конструкций.

Каждый из серотипов AAV 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, rh8, rh10, rh39, rh43 и Anc80 может быть подготовлен для инкапсуляции анти-VEGF белковых конструкций и формирования частиц гAAV. Среди прочего, частицы гAAV могут быть использованы для тестирования (i) стратегии конкатемеризации-трансплайсинга, (ii) гибридной стратегии интронной-гомологичной рекомбинации-трансплайсинга, (iii) стратегии экзонно-гомологичной рекомбинации, как кратко описано в публикации Pryadkina et al., Meth. Clin. Devel. 2:15009, 2015, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки, и/или (iv) стратегии применения одной конструкции.

Пример 1.1: Создание конструкций гAAV-ранибизумаб, гAAV-ранибизумаб-PC и гAAV-бевацизумаб-PC

[0712] В данном примере представлено описание процесса создания конструкций гAAV-ранибизумаб, гAAV-ранибизумаб-GFP и гAAV-бевацизумаб-PC, как описано в данном документе. Первая рекомбинантно полученная конструкция имела последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 90. Эта конструкция упоминается в Примерах как «конструкция гAAV-ранибизумаб-PC». Конструкция гAAV-ранибизумаб-PC является иллюстративным вариантом осуществления конструкции гAAV-V_H/V_L, представленной схемой, показанной на **фиг. 6, панель (A)**, и включает последовательность, кодирующую ранибизумаб. Вторая полученная рекомбинантным путем конструкция имела последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 91. Эта конструкция упоминается в Примерах как «конструкция гAAV-ранибизумаб». Конструкция гAAV-ранибизумаб является иллюстративным вариантом осуществления конструкции гAAV-V_H/V_L, представленной схемой, показанной на **фиг. 6, панель (A)**, и включает последовательность, кодирующую ранибизумаб. Третья полученная рекомбинантным путем конструкция имела последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 106. Эта конструкция упоминается в Примерах как «конструкция гAAV-ранибизумаб-GFP». Конструкция гAAV-ранибизумаб-GFP является иллюстративным вариантом осуществления конструкции гAAV-ABGFP, представленной схемой, показанной на **фиг. 6, панель (B)**, и включает последовательность, кодирующую ранибизумаб. Четвертая полученная рекомбинантным путем конструкция имела последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 93. Эта конструкция упоминается в Примерах как «конструкция гAAV-бевацизумаб-PC». Конструкция гAAV-бевацизумаб-PC является иллюстративным вариантом осуществления конструкции гAAV-AB, представленной схемой, показанной на **фиг. 6, панель (C)**, и включает последовательность, кодирующую анти-VEGF белок бевацизумаб.

[0713] Определенные конструкции, описанные выше, трансплазида с генами Rep и

Сар AAV и хелперная плазмида с основной областью из генома аденовируса были совместно трансфицированы в клетки HEK293. Затем с помощью описанной выше конструкции гAAV генерировали капсид AAVAnc80 с образованием частиц гAAVAnc80-ранибизумаб, гAAVAnc80-ранибизумаб-PC и гAAVAnc80-бевацизумаб-PC.

Пример 1.2: Создание конструкций гAAV-бевацизумаб, гAAV-бевацизумаб-GFP, гAAV-афлиберцепт-PC и гAAV-афлиберцепт

[0714] В этом примере представлено описание создания конструкций гAAV-бевацизумаб, гAAV-бевацизумаб-GFP, гAAV-афлиберцепт-PC и гAAV-афлиберцепт, как описано в данном документе. Одна конструкция имеет последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 94. Эта конструкция упоминается в Примерах как «конструкция гAAV-бевацизумаб». Конструкция гAAV-бевацизумаб является иллюстративным вариантом осуществления конструкции гAAV-AB, представленной схемой, показанной на **фиг. 6, панель (C)**, и содержит последовательность, которая кодирует анти-VEGF белок бевацизумаб. Другая конструкция имеет последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 107. Эта конструкция упоминается в Примерах как «конструкция гAAV-бевацизумаб-GFP». Конструкция гAAV-бевацизумаб-GFP является иллюстративным вариантом осуществления конструкции гAAV-ABGFP, представленной схемой, показанной на **фиг. 6, панель (B)**, и содержит последовательность, которая кодирует анти-VEGF белок бевацизумаб. Другая конструкция имеет последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 95. Эта конструкция упоминается в Примерах как «конструкция гAAV-афлиберцепт-PC». Конструкция гAAV-афлиберцепт-PC является иллюстративным вариантом осуществления конструкции гAAV-TRAP, представленной схемой, показанной на **фиг. 6, панель (D)**, и содержит последовательность, которая кодирует анти-VEGF белок афлиберцепт. Другая конструкция имеет последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 96. Эта конструкция упоминается в Примерах как «конструкция гAAV-афлиберцепт». Конструкция гAAV-афлиберцепт является иллюстративным вариантом осуществления конструкции гAAV-TRAP, представленной схемой, показанной на **фиг. 6, панель (D)**, и включает последовательность, кодирующую анти-VEGF белок афлиберцепт. Частицы гAAV генерируют путем трансфекции с помощью способа, не требующего применения аденовирусов, как описано в работе Xiao et al. J Virol. 73(5):3994-4003, 1999, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки. Отдельную конструкцию гAAV-бевацизумаб-PC, гAAV-бевацизумаб-GFP, гAAV-афлиберцепт-PC или гAAV-афлиберцепт, как описано выше, трансплазмиду с генами Rep и Сар AAV и хелперную плазмиду с основной областью из генома аденовируса совместно трансфицируют в клетки

НЕК293. Затем капсид AAVAnc80 генерируют с применением описанной выше конструкции rAAV с получением частиц rAAVAnc80-бевацизумаб, rAAVAnc80-бевацизумаб-PC, rAAV-Anc80-ранибизумаб-GFP, rAAVAnc80-афлиберцепт-PC и rAAVAnc80-афлиберцепт.

Пример 2. Очистка вирусных частиц

[0715] В данном примере представлено описание способов, которые могут быть применены для очистки конструкций, кодирующих анти-VEGF белки, как описано в данном документе.

Пример 2.1: Очистка частиц rAAVAnc80-ранибизумаб, rAAVAnc80-ранибизумаб-PC и rAAVAnc80-бевацизумаб-PC

[0716] В данном примере представлено описание способов, которые могут быть применены для очистки частиц rAAV, кодирующих анти-VEGF белки, например, частиц, полученных в примере 1. Частицы rAAVAnc80-ранибизумаб, rAAVAnc80-ранибизумаб и rAAVAnc80-бевацизумаб-PC, полученные в примере 1.1, подвергали очистке по отдельности двумя последовательными градиентами плотности хлорида цезия (CsCl), как описано в публикации Pryadkina et al., Mol. Ther. 2:15009, 2015, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки. После второй стадии центрифугирования градиента плотности CsCl, 11 фракций по 500 мкл извлекали из пробирки с градиентом плотности CsCl и очищали диализом в 1 × ФСБ. Фракции анализировали с помощью дот-блоттинга, чтобы определить те частицы, которые содержат геномы rAAV. Количество вирусных геномов (вг) каждого препарата определяли методом а количественного титрования на основе ПЦР в реальном времени с использованием праймеров и зондов, соответствующих области ITR генома конструкции на основе AAV (см., например, Bartoli et al. Gene. Ther. 13:20-28, 2006, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки).

Пример 2.2: Очистка частиц rAAVAnc80-ранибизумаб-GFP, rAAVAnc80-бевацизумаб, rAAVAnc80-бевацизумаб-GFP, rAAVAnc80-афлиберцепт и rAAVAnc80-афлиберцепт-PC

[0717] В данном примере также представлено описание способов, которые могут быть использованы для очистки частиц rAAV, кодирующих анти-VEGF белки, например, те, которые образованные в примере 1. Частицы rAAVAnc80-ранибизумаб, полученные в

примере 1.1, и частицы rAAVAnc80-бевацизумаб, rAAVAnc80-бевацизумаб-GFP, rAAVAnc80-афлиберцепт-PC и rAAVAnc80-афлиберцепт, полученные в примере 1.2, подвергают очистке по отдельности двумя последовательными градиентами плотности хлорида цезия (CsCl), как описано в публикации Pryadkina et al., Mol. Ther. 2:15009, 2015, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки. После второй стадии центрифугирования градиента плотности CsCl, 11 фракций по 500 мкл извлекают из пробирки с градиентом плотности CsCl и очищают диализом в 1 × ФСБ. Фракции анализируют с помощью дот-блоттинга, чтобы определить те, которые содержат геномы rAAV. Количество вирусных геномов (вг) каждого препарата определяют методом количественного титрования на основе ПЦР в реальном времени с использованием праймеров и зонда, соответствующих области ITR генома конструкции на основе AAV (см., например, Bartoli et al. Gene Ther. 13:20-28, 2006, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки).

Пример 2.3. Очистка частиц rAAVAnc80

[0718] В этом примере также представлено описание дополнительных способов, которые можно применять для очистки частиц rAAV, кодирующих анти-VEGF белки, например, полученных в примере 1. Частицы rAAV-анти-VEGF очищают следующим образом через 72 часа после трансфекции. К раствору добавляют 10% Тритон (до конечной концентрации 2%) и культуру клеток инкубируют в течение 1 часа при температуре 37°C в шейкере для клеток. Затем добавляют 100 ед/мл бензоназы и 2 мкМ MgCl₂ и клетки инкубируют в течение 2 часов при температуре 37°C в шейкере для клеток. Затем добавляют NaCl (150 мкМ) и клетки инкубируют в течение 20 минут при температуре 37°C в шейкере для клеток. Образцы центрифугируют при 2000xg в течение 10 минут. Супернатант переносят в чистый контейнер и хранят при температуре -80°C или сразу же подвергают тангенциально-поточной фильтрации (TFF). Затем отфильтрованный супернатант загружают в колонки AVB для колоночной хроматографии AVB и фильтрации rAAV. Затем отфильтрованный элюат подвергают центрифугированию в градиенте плотности CsCl (RI = 1,3905–1,3915, скорость вращения = 65 000 об/мин в течение ≥ 16 ч при 15°C). Очищенный образец с полными частицами затем подвергают заключительному циклу TFF, и составы помещают во флаконы для последующего применения.

Пример 3. Составление частиц rAAVAnc80-анти-VEGF

[0719] Этот пример относится к приготовлению композиций, содержащих вирусные

частицы, включая конструкции, кодирующие анти-VEGF белок, как описано в данном документе.

Пример 3.1. Составление частиц гAAV Anc80-ранибизумаб, гAAV Anc80-ранибизумаб-PC и гAAV Anc80-бевацизумаб-PC

[0720] Частицы гAAV Anc80, включающие конструкции гAAV-ранибизумаб, гAAV-ранибизумаб-PC или гAAV-бевацизумаб-PC, каждая из которых кодирует анти-VEGF белок, как описано в данном документе, были получены и очищены, как указано в приведенных выше примерах, до соответствующего титра, как определяется с помощью количественной капельной цифровой (кц) ПЦР (*например*, приблизительно $1,39^{13}$ вг/мл). Затем получали очищенные частицы в известных разведениях (*например*, при 6×10^4 , $1,3 \times 10^5$, $1,8 \times 10^5$, $4,5 \times 10^9$ и $1,3 \times 10^{10}$ вг/мл) в физиологически приемлемом растворе. Используемый физиологически приемлемый раствор включал коммерчески доступный 1xФСБ с плюроновой кислотой F68, доведенный до конечной концентрации: 8,10 мМ двухосновного фосфата натрия, 1,5 мМ монофосфата калия, 2,7 мМ хлорида калия, 172 мМ хлорида натрия и 0,001% плюрониловой кислоты F68). Количественную оценку титра частиц гAAV Anc80-ранибизумаб, частиц гAAV Anc80-ранибизумаб-PC или частиц гAAV Anc80-бевацизумаб-PC проводили с использованием последовательности прямого праймера: CCGATTTTCGGCCTATTGGTTA (SEQ ID NO: 100), последовательности обратного праймера CTGTGGAGAGAAAGGCAAAGT (SEQ ID NO: 101) и последовательности зонда GGCACCTATTGGTCTTACTGACATCC (SEQ ID NO: 102) с соответствующим флуорофором (FAM).

Пример 3.2. Составление частиц гAAV Anc80-ранибизумаб, гAAV Anc80-ранибизумаб-PC и гAAV Anc80-бевацизумаб-PC

[0721] Частицы гAAV Anc80, включающие конструкции гAAV-ранибизумаб-GFP, гAAV-бевацизумаб, гAAV-бевацизумаб-GFP, гAAV-афлиберцепт или гAAV-афлиберцепт-PC, каждая из которых кодирует анти-VEGF белок, как описано в данном документе, получают и очищают, как указано в приведенных выше примерах, до соответствующего титра, как определяется с помощью количественной капельной цифровой (кц) ПЦР (*например*, приблизительно $1,39^{13}$ вг/мл). Затем получают очищенные частицы в известных разведениях (*например*, при 6×10^4 , $1,3 \times 10^5$, $1,8 \times 10^5$, $4,5 \times 10^9$ и $1,3 \times 10^{10}$ г/мл) в физиологически приемлемом растворе. Используемый физиологически приемлемый раствор может включать коммерчески доступный 1xФСБ с плюроновой кислотой F68, и может быть доведен до конечной концентрации: 8,10 мМ двухосновного фосфата натрия,

1,5 мМ монофосфата калия, 2,7 мМ хлорида калия, 172 мМ хлорида натрия и 0,001% плюрониловой кислоты F68). Количественное определение титра частиц гAAVAnc80-ранибизумаб-GFP, частиц гAAVAnc80-бевацизумаб, частиц гAAVAnc80-бевацизумаб-GFP, частиц гAAVAnc80-афлиберцепт или частиц гAAVAnc80-афлиберцепт-PC проводят с использованием прямой последовательности праймера: CCGATTTCCGGCCTATTGGTTA (SEQ ID NO: 100), обратной последовательности праймера CTGTGGAGAGAAAGGCAAAGT (SEQ ID NO: 101), и последовательности зонда GGCACCTATTGGTCTTACTGACATCC (SEQ ID NO: 102) с соответствующим флуорофором (например, FAM).

Пример 4. Описание устройства

[0722] Этот пример относится к устройству, подходящему для доставки частиц гAAV, включая частицы гAAV, содержащие конструкции, кодирующие описанные в данном документе анти-VEGF белки, во внутреннее ухо. Специализированный микрокатетер, предназначенный для последовательного и безопасного проникновения через мембрану круглого окна, можно использовать для доставки композиции, представленной в настоящем документе, в улитку субъекта (например, как показано на **фигуре 4**). Микрокатетер имеет такую форму, что хирург, выполняющий процедуру доставки, может войти в полость среднего уха через наружный слуховой проход и привести в контакт конец микрокатетера с мембраной круглого окна. Дистальный конец микрокатетера может включать по меньшей мере одну микроиглу диаметром от около 10 микрон до около 1000 микрон, которая создает отверстия в мембране круглого окна, достаточные для того, чтобы частицы гAAV, включающие конструкции, описанные в настоящем документе (*например*, включающие кодирующую последовательность для анти-VEGF белка) проникали в улитковую перилимфу барабанной лестницы со скоростью, которая не повреждает внутреннее ухо (*например*, физиологически приемлемой скоростью, *например*, скоростью от приблизительно 30 мкл/мин до приблизительно 90 мкл/мин), но которая достаточно мала, чтобы вылечить без хирургического вмешательства. В оставшуюся часть микрокатетера, проксимальную к микроиглам (иглам), загружают состав гAAV/искусственной перилимфы с определенным титром (*например*, приблизительно от 1×10^{12} до 5×10^{13} вг/мл). Проксимальный конец микрокатетера подсоединен к микроманипулятору, который позволяет проводить точные инфузии небольшого объема от приблизительно 30 мкл до приблизительно 100 мкл.

Пример 5: Экспрессия и секреция анти-VEGF белков, полученных из клеточных линий

[0723] Этот пример относится к трансдукции и/или трансфекции иллюстративных конструкций и экспрессии и секреции иллюстративных белков, описанных в данном документе.

Пример 5.1: Экспрессия и секреция белков из конструкций гAAV-ранибизумаб-PC, гAAV-ранибизумаб-GFP и гAAV-бевацизумаб-PC

[0724] Линии клеток (*например*, HEK293FT) трансфицировали иллюстративными конструкциями гAAV-анти-VEGF или трансдуцировали иллюстративными частицами гAAVAnc80-анти-VEGF, как описано в данном документе. Для событий трансфекции клетки HEK293FT высевали в течение ночи в количестве 7×10^4 клеток/лунку в формате 24-луночного планшета с объемом культуры 400 мкл. Приблизительно 800 нг анти-VEGF конструкций гAAV-ранибизумаб-PC, гAAV-бевацизумаб-PC или гAAV-ранибизумаб-GFP (как описано в примере 1) трансфицировали в клетки с применением реагента для трансфекции jetprime (Polyplus-transfection® SA). Для событий трансдукции клетки HEK293FT высевали в течение 6 часов по 4×10^4 клеток/лунку в формат 96-луночного планшета с объемом культуры 50 мкл в присутствии 2 мкМ этопозида (Fisher Scientific 34120525MG), иллюстративные частицы гAAVAnc80-бевацизумаб-PC (как описано в примере 1) добавляли в среду при MOI $7,5 \times 10^4$, $2,2 \times 10^5$ и $5,5 \times 10^5$, соответственно. Для трансфицированных или трансдуцированных клеток, супернатант собирали через 72 часа после обработки для каждого образца. Для анализа экспрессии белка 30 мкл образцов загружали в отдельные лунки в 4-12% белковом геле Bis-Tris и проводили стандартные процедуры вестерн-блоттинга, известные в данной области техники. Характеристики полос определяли с использованием флуоресцентного считывающего устройства с тестируемым антителом к ранибизумабу (нацеленным на эпитоп Fab; поставляется Abcam, ab168684-25UG) в качестве первичного зонда для обнаружения и античеловеческим IgG в качестве вторичного зонда для обнаружения (см. **фиг. 7**).

Пример 5.2. Экспрессия и секреция белков из конструкций гAAV-ранибизумаб и гAAV-бевацизумаб, гAAV-бевацизумаб-GFP, гAAV-афлиберцепт и гAAV-афлиберцепт-PC

[0725] Линии клеток (*например*, HEK293FT) трансфицируют иллюстративными анти-VEGF конструкциями или трансдуцируют иллюстративными частицами гAAVAnc80-анти-VEGF, как описано в данном документе. Для событий трансфекции клетки HEK293FT

высеивают в течение ночи в количестве приблизительно 7×10^4 клеток/лунку в формате 24-луночного планшета с объемом культуры 400 мкл. Приблизительно 800 нг конструкций rAAV-ранибизумаб, rAAV-бевацизумаб, rAAV-бевацизумаб-GFP, rAAV-афлиберцепт-PC или rAAV-афлиберцепт (*например*, как описано в примере 1) трансфицировали в клетки с использованием реагента для трансфекции jetprime (Polyplus-transfection® SA). Для событий трансдукции клетки HEK293FT высеивают в течение 6 часов по 4×10^4 клеток/лунку в формат 96-луночного планшета с объемом культуры 50 мкл в присутствии 2 мкМ этопозида (Fisher Scientific 34120525MG). rAAVAnc80-ранибизумаб, rAAVAnc80-ранибизумаб-PC, rAAVAnc80-ранибизумаб-GFP, rAAVAnc80-бевацизумаб, rAAVAnc80-бевацизумаб-GFP, rAAVAnc80-афлиберцепт-PC или rAAVAnc80-афлиберцепт (*например*, как описано в примере 1) добавляют в лунку среды при MOI приблизительно $7,5 \times 10^4$, $2,2 \times 10^5$ и/или $5,5 \times 10^5$. Для трансфицированных или трансдуцированных клеток, супернатант собирают через приблизительно 72 часа после обработки для каждого образца. Для анализа экспрессии белка 30 мкл образцов загружают в отдельные лунки в 4-12% белковом геле Bis-Tris и проводят стандартные процедуры вестерн-блоттинга, известные в данной области техники. Характеристики полос определяют с использованием флуоресцентного считывающего устройства с тестируемым антителом к ранибизумабу (нацеленным на эпитоп Fab; поставляется Abcam, ab168684-25UG) и тестируемым антителом к афлиберцепту в качестве первичного зонда для обнаружения, и античеловеческим IgG в качестве вторичного зонда для обнаружения.

Пример 6. Активность связывания анти-VEGF белков, полученных из клеточных линий

[0726] В этом примере описывается, как определить активность связывания иллюстративных анти-VEGF белков, полученных, как описано в примере 5 выше.

Пример 6.1. Активность связывания анти-VEGF белков, ранибизумаба и бевацизумаба

[0727] Активность связывания иллюстративных анти-VEGF белков, ранибизумаба или бевацизумаба, полученных посредством трансфекции, как описано в примере 5 выше, анализировали с использованием биосенсорных инструментов Octet® НТХ. Первая серия контрольных экспериментов была проведена для калибровки прибора поверхностного плазмонного резонанса, *например*, с использованием мышинового моноклонального антитела к VEGF человека (анти-hVEGF MmAb; R&D Systems, MAB293-100), добавленного в среду,

кондиционированную контрольными клетками, с использованием рекомбинантного VEGF человека в качестве связывающего агента (**фиг. 8, панель (А)**). Вторую серию экспериментов проводили для определения VEGF-связывающей активности частиц, содержащихся в кондиционированной среде из клеток HEK293TF, после трансфекции иллюстративных конструкций гAAV-ранибизумаб-PC или гAAV-бевацизумаб-PC, как описано в примере 1, или контрольной неконтролируемой среды для трансфицированных клеток. Графическое представление результатов для испытываемых материалов приведено на **фиг. 8, панель (В)** или **панель (С)**, с контрольной средой, представленной на **фиг. 8, панель (D)**.

[0728] Тестовые образцы включали растворимые ранибизумаб и бевацизумаб, секретируемые и присутствующие в среде из клеток HEK293TF, трансфицированных конструкциями гAAV-ранибизумаб-PC или гAAV-бевацизумаб-PC, как описано в примере 1. Образцы готовили путем разбавления среды, кондиционированной клетками, в соотношении 1:10 в 1x кинетического буфера (Fortebio, 18-1105) и разделяли на аликвоты в 384-луночный планшет для образцов. Анти-hVEGF MmAb (R&D Systems, MAB293-100) разводили в концентрации 10 мкг/мл в качестве положительного контроля. Агент захвата, рекомбинантный VEGF человека (R&D Systems, 293-VE-010), разводили серией разведений в соотношении 1:2 в концентрации от 200 нМ до 3,125 нМ.

[0729] Аффинность связывания образцов кондиционированной среды и образцов мышинового антитела к VEGF человека (R&D Systems) измеряли в 1x кинетическом буфере в биосенсорном приборе Octet® HTX. Характеристики и значения связывания были получены с помощью аналитического программного обеспечения Octet®, Data Analysis HT10.0. Собранные данные представлены в **таблице 2**, где представлены соответствующие K_D , равновесная константа ассоциации (k_a) и диссоциация (k_{dis}).

[0730] Мышиное антитело к hVEGF (R&D Systems) показало высокую аффинность связывания. Аналогично, конструкция гAAV, кодирующая ранибизумаб или бевацизумаб, показала высокую аффинность связывания с VEGF человека. Никакое значение K_D не могло быть экстраполировано из данных связывания контрольного образца кондиционированной среды. В совокупности эти данные показывают, что конструкции, представленные в данном документе, могут приводить к экспрессии и секреции анти-VEGF белков, ранибизумаба или бевацизумаба, и что конструкции, представленные в данном документе, могут быть использованы для экспрессии анти-VEGF белков во внутреннем ухе млекопитающего.

[0731] **Таблица 2: Кинетика связывания рекомбинантных анти-VEGF белков**

ID образца	KD (M)*	ka (1/Mc)	kdis(1/c)	Полный R^2
Бевацизумаб	3,30E-10	8,49E+04	2,80E-05	0,9998
Ранибизумаб	1,68E-10	2,45E+05	4,11E-05	0,9991
MmAb-R&D	2,29E-10	3,40E+05	7,77E-05	0,9993

[0732] Секретируемый ранибизумаб был способен связывать биотинилированный рекомбинантный VEGF человека (Acro Biosystems, VE5-H8210) с KD 168 пМ, а секретируемый бевацизумаб был способен связываться с KD 330 пМ (KD = 229 пМ для положительного контрольного мышинового рекомбинантного антитела к VEGF человека [R&D Systems, MAB293-100]). По сравнению с аффинностью связывания ранибизумаба и бевацизумаба с VEGF-A165, 20,6 и 35,1 пМ, соответственно (Paradopoulos 2012, полностью включена в данный документ посредством ссылки), эти данные свидетельствуют о том, что конструкции гAAV в плазмидной форме, содержащие последовательность, кодирующую анти-VEGF белок, способны продуцировать белок *in vitro* с приемлемой аффинностью связывания.

Пример 6.2. Активность связывания анти-VEGF белков, ранибизумаба, бевацизумаба и афлиберцепта

[0733] Активность связывания иллюстративных анти-VEGF связывающих агентов, как описано в данном документе, анализируют с использованием биосенсорных инструментов Octet® HTX. Анти-VEGF белки продуцируются в клеточных линиях (*например*, клетках HEK293FT) после трансфекции иллюстративных конструкций гAAV-ранибизумаб, гAAV-бевацизумаб, гAAV-ранибизумаб-GFP, гAAV-бевацизумаб-GFP, гAAV-афлиберцепт-PC или гAAV-афлиберцепт, как описано в примере 1, или трансдуцируются с помощью тех же конструкций, содержащихся в капсиде Anc80 AAV, с образованием частицы гAAV, *например*, частицы гAAVAnc80-ранибизумаб, частицы гAAVAnc80-бевацизумаб, частицы гAAVAnc80-ранибизумаб-GFP, частицы гAAVAnc80-бевацизумаб-GFP, частицы гAAVAnc80-афлиберцепт-PC или частицы гAAVAnc80-афлиберцепт. Первую серию контрольных экспериментов проводят для калибровки прибора поверхностного плазмонного резонанса, *например*, с использованием мышинового моноклонального антитела к VEGF человека (анти-hVEGF MmAb; R&D Systems, MAB293-100) в кондиционированной контролем среде, с использованием рекомбинантного VEGF человека в качестве связывающего агента. Вторую серию экспериментов проводят для определения VEGF-связывающей активности кондиционированной среды из клеток HEK293TF после трансфекции или трансдукции иллюстративных конструкций или частиц гAAV, как

описано в данном документе, или контрольной кондиционированной среды. Графическое представление отображает иллюстративную активность связывания трансгенных анти-VEGF белков.

[0734] Тестовые образцы включают растворимые ранибизумаб, бевацизумаб и/или афлиберцепт, секретируемые и присутствующие в среде из клеток НЕК293TF, трансдуцированных или трансфицированных конструкциями, как описано в данном документе (*например*, как описано в примере 1). Образцы готовят путем разбавления среды, кондиционированной клетками, 1:10 в 1x кинетическом буфере (Fortebio, 18-1105), и разделения на аликвоты в 384-луночный планшет для образцов. Анти-hVEGF MmAb (R&D Systems, MAB293-100) разводят в концентрации 10 мкг/мл в качестве положительного контроля. Агент захвата, рекомбинантный VEGF человека (R&D Systems, 293-VE-010), разводят серией разведений в соотношении 1:2 в концентрации от 200 нМ до 3,125 нМ.

[0735] Аффинность связывания образцов кондиционированной среды и образцов мышинового антитела к VEGF человека (R&D Systems) измеряют в 1x кинетическом буфере в биосенсорном приборе Octet® HTX. Характеристики и значения связывания генерируют с применением аналитического программного обеспечения Octet®, Data Analysis HT10.0. Собранные данные представлены в виде K_D , равновесной константы ассоциации (k_a) и скорости диссоциации (k_{dis}).

Пример 7. Демонстрация *ex vivo* продукции анти-VEGF белка

[0736] Этот пример относится к введению и анализу экспрессии конструкций гAAV, экспрессирующих анти-VEGF белок, в эксплантатах улитки млекопитающих, выращенных *in vitro* или *ex vivo*. Модели культур эксплантатов улитки могут обеспечить надежную экспериментальную систему для имитации морфологии и молекулярных характеристик сенсорных волосковых клеток и несенсорных поддерживающих клеток улитки для изучения трансдукции и экспрессии частиц гAAV в пределах внутренней клеточной среды, обнаруженной *in-vivo*.

Пример 7.1. Продукция *ex vivo* анти-VEGF белков, ранибизумаба и бевацизумаба

[0737] В данном документе описаны оценки *ex vivo* экспрессии и секреции анти-VEGF белка из эксплантатов улитки новорожденных (P2) мышей дикого типа (ДТ), трансдуцированных частицами гAAV (*например*, гAAVAnc80), содержащими конструкции

гAAV-V_H/V_L или гAAV-AB, в качестве примеров приведены гAAV-ранибизумаб-PC или гAAV-бевацизумаб-PC (как описано в примере 1). В этих экспериментах кортиев орган вырезали и помещали на покровные стекла с последующей инкубацией в течение трех-четырех дней либо с несущей средой, либо с рядом доз частиц гAAV и частиц гAAVAnc80-ранибизумаб-PC или частиц гAAVAnc80-бевацизумаб-PC. Частица гAAVAnc80-бевацизумаб-PC трансдуцировалась при 1,2E10, 2,4E10 и 3,5E10 гв/эксплантат, тогда как частица гAAVAnc80-ранибизумаб-PC трансдуцировалась при 1,4E10, 2,8E10 и 4,2E10 гв/эксплантат.

[0738] Среду, окружающую эксплантаты, собирали и анализировали с помощью иммунологического анализа MSD, платформы, использующей технологию электрохемилюминесцентного обнаружения для количественного определения аналитов с более высокой чувствительностью и большим динамическим диапазоном, чем традиционный анализ ELISA. Покрытые стрептавидином планшеты для анализа MSD блокировали и покрывали биотинилированным лигандом VEGF перед инкубацией с образцом. Анти-VEGF белки, связанные с планшетом для анализа, затем обнаруживали с помощью меченого козьего поликлонального антитела с легкой к-цепью (pAb) (**фиг. 16, панель (B)**). Экспланты лизировали для анализа экспрессии рибонуклеиновой кислоты (РНК) с использованием количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени (кРВ-ПЦР) с праймерами-зондами Taqman для GAPDH (контроль «домашнего хозяйства») и для нуклеотидов, кодирующих анти-VEGF белок (продукты мРНК, кодирующие бевацизумаб или ранибизумаб) (**фиг. 16, панель (A)**).

[0739] РНК анти-VEGF была обнаружена в эксплантах, получавших частицы гAAVAnc80-анти-VEGF, но не в эксплантах, получавших несущую среду (**фиг. 16, панель (A)**), а секретируемый анти-VEGF белок был обнаружен в средах эксплантов, получавших частицы гAAVAnc80-анти-VEGF, но не получавших несущую среду (**фиг. 16, панель (B)**). Эти данные свидетельствуют о том, что введение частиц гAAVAnc80-анти-VEGF, содержащих конструкции, кодирующие анти-VEGF белки, в улитку мышей дикого типа *ex vivo* приводит к экспрессии и секреции белка-мишени из трансдуцированных клеток. Результаты эксплантатов улитки подтверждают тестирование *in vivo* внутрикохлеарной инъекции мышам дикого типа частиц гAAVAnc80-анти-VEGF для определения, по меньшей мере, переносимости *in vivo*, а также для оценки секретируемых *in vivo* уровней анти-VEGF белка.

Пример 7.2. Продукция *ex vivo* анти-VEGF белков, ранибизумаба, бевацизумаба и афлиберцепта

[0740] Имитационные частицы гAAV или частицы гAAV гAAVAnc80-ранибизумаб, гAAVAnc80-ранибизумаб-GFP, гAAVAnc80-бевацизумаб, гAAVAnc80-бевацизумаб-GFP, гAAVAnc80-афлиберцепт-PC или гAAVAnc80-афлиберцепт (*например*, как описано в примере 1) готовят и трансдуцируют в эксплантаты улитки новорожденных (P2) мышей дикого типа (ДТ) при подходящей MOI (*например*, при $1,2E10$, $1,4E10$, $2,4E10$, $2,8E10$, $3,5E10$ и/или $4,2E10$ гв/эксплантат и т. д.) В этих экспериментах кортиева орган вырезают и помещают на покровные стекла с последующей инкубацией в течение трех-четырех дней либо с несущей средой, либо с рядом доз частиц гAAVAnc80-ранибизумаб, частиц гAAVAnc80-ранибизумаб-GFP, частиц гAAVAnc80-бевацизумаб, частиц гAAVAnc80-бевацизумаб-GFP, частиц гAAVAnc80-афлиберцепт-PC или частиц гAAVAnc80-афлиберцепт, как описано в примере 1. Среды, окружающие экспланты, собирают и анализируют с помощью иммунологического анализа MSD. Покрытые стрептавидином планшеты для анализа MSD блокируют и покрывают биотинилированным лигандом VEGF перед инкубацией с образцом. Анти-VEGF белки (*например*, ранибизумаб, бевацизумаб и/или афлиберцепт), связанные с планшетом для анализа, затем выявляют с помощью меченого козьего поликлонального антитела с легкой к-цепью (pAb).

[0741] Необязательно проводят эксперименты для определения уровня экспрессии мРНК из конструкций гAAV-анти-VEGF, трансдуцированных в эксплантаты дикого типа (*ex vivo*). Имитационные частицы гAAV или частицы гAAV, содержащие конструкции гAAV (*например*, как описано в примере 1), инкапсулированные капсидами Anc80, готовят и трансдуцируют в эксплантаты при подходящей MOI (*например*, при той, что описана выше, и/или при MOI приблизительно $4,5 \times 10^9$ вг/улитку или $1,5 \times 10^{10}$ вг/улитку). Супернатант собирают, и клетки собирают через 72 часа после трансдукции с использованием 350 мкл буфера для лизиса РНК RLT Plus (Qiagen) и готовят образцы РНК с использованием микро-набора RNeasy Micro Kit (Qiagen). Относительные уровни экспрессии мРНК определяют с помощью количественной ПЦР в реальном времени с использованием амплифицирующих праймеров, специфичных для нуклеотидов, кодирующих анти-VEGF белок (*например*, праймеров, специфичных для нуклеотидов, кодирующих бевацизумаб, ранибизумаб и/или афлиберцепт), и зонда TaqMan, и сравнивают с соответствующим контролем (*например*, мышинный зонд GAPDH в качестве контроля (Life Technologies)). Наблюдается устойчивая и дозозависимая продукция мРНК, кодирующей анти-VEGF белок. Уровни растворимого и секретируемого анти-VEGF белка определяют, как описано выше.

Пример 8. Хирургические способы и анализ частиц гAAV на модельных животных

[0742] Настоящий пример относится к введению технологий (например, конструкций, частиц и/или композиций), описанных в данном документе, во внутреннее ухо старых мышей. Частицы гAAV, содержащие конструкцию, кодирующую анти-VEGF белок, готовят в буфере для состава (*например*, искусственная перилимфа или 1хФСБ с плюроновой кислотой F68), а затем вводят в барабанную лестницу у мышей, как описано Shu et al. (Human Gene Therapy, doi: 10.1089/hum.2016.053, июнь 2016 г., которая полностью включена в данный документ посредством ссылки). Самцов и самок мышей старше P15 анестезируют путем внутрибрюшинной инъекции ксилазина (приблизительно 5-10 мг/кг) и кетамина (приблизительно 90-120 мг/кг). Температуру тела поддерживают на уровне 37 °C с помощью электрической грелки. В правой постаурикулярной области делается разрез и обнажаются барабанная булла и задний полукружный канал. Буллу перфорируют хирургической иглой, а небольшое отверстие расширяют, чтобы обеспечить доступ к улитке. Кость латеральной стенки улитки барабанной лестницы истончается с помощью бормашины, так что перепончатая латеральная стенка остается нетронутой. Затем просверливают небольшое отверстие в заднем полукружном канале. Проподимость каналостомы подтверждается визуализацией медленного вытока перилимфы. Нанолитровая система микроинъекций в сочетании со стеклянной микропипеткой используется для доставки в общей сложности приблизительно 1 мкл конструкции, содержащей буфер (*например*, конструкции гAAV, описанные в данном документе, с концентрацией приблизительно от $4,5 \times 10^9$ до 5×10^{10} вг/улитку в искусственной перилимфе или 1хФСБ с плюрониловой кислотой F68) в барабанную лестницу со скоростью 2 нл/сек. Стеклянную микропипетку оставляют на 5 минут после инъекции. После кохлеостомии и инъекции отверстие в барабанной булле и задний полукружный канал закрывают небольшими кусочками жировой ткани, а мышцы и кожу зашивают. Мышам дают проснуться от анестезии, и их боль контролируют с помощью 0,15 мг/кг гидрохлорида бупренорфина в течение 3 суток.

[0743] Исследования, подобные тем, что описаны в настоящем примере, проводят в рамках подготовки к первым испытаниям безопасности и повышения дозы с участием людей у взрослых участников с односторонней прогрессирующей спорадической ВШ. Внутрикохлеарная доставка гAAV (*например*, AAVAnc80, *например*, AAVAnc80-анти-VEGF) может применяться для трансдукции кохлеарных и вестибулярных клеток внутреннего уха, которые затем, как ожидается, будут секретировать анти-VEGF белок в перилимфу или непосредственно в интерстициальную жидкость улиткового нерва.

Отсутствие барьеров для диффузии вдоль внутреннего слухового прохода приводит к тому, что улитковый нерв находится в непрерывном потоке жидкости, с перилимфой на его латеральном конце (ближайшем к улитке, где возникает большинство опухолей ВШ (фиг. 1 и 3) и СМЖ на медиальном конце; таким образом, диффузия из перилимфы в интерстиций нерва обеспечивает путь для терапевтического анти-VEGF белка, экспрессируемого в перилимфе, для достижения предполагаемой мишени ВШ.

[0744] У мышей хирургический доступ, например, описанный в публикации Yoshimura et al., 2018, можно использовать для доставки частиц гAAV, как описано в данном документе (Yoshimura 2018, полностью включена в данный документ посредством ссылки). В частности, применяют доставку через мембрану круглого окна с фенестрацией заднего полукружного канала, которая продемонстрировала эффективность и надежность трансдукции, не зависимо от возраста животного на момент инъекции (публикация Yoshimura 2018, полностью включена в данный документ посредством ссылки). Осуществляется заушной разрез для доступа к височной кости. Часть грудино-ключично-сосцевидной мышцы рассекают, чтобы обнажить слуховой пузырь. Отологическим сверлом диаметром от 0,5 до 0,6 мм делают небольшое отверстие в пузыре; затем отверстие расширяют, чтобы визуализировать стремennую артерию и мембрану круглого окна. Фенестрацию заднего полукружного канала выполняют отологическим сверлом (диаметром 0,5–0,6 мм), чтобы оно служило отверстием внутреннего уха во время кохлеарного введения. В мембрану круглого окна проводят устройство доставки для мышей, которое содержит боросиликатную капиллярную пипетку и 10 мкл шприц Гамильтона, и 1 мкл раствора, содержащего вирусные частицы (приблизительно 40-50% от общего объема внутреннего уха), доставляют через мембрану круглого окна в барабанную лестницу со скоростью 300 нл/мин. Исследования частиц AAVAnc80, содержащих конструкции, кодирующие анти-VEGF белок, проводят на мышах со зрелыми улитками.

Пример 9. Трансгенная экспрессия, анализ и визуализация анти-VEGF белков у мышей

[0745] Этот пример относится к трансгенной экспрессии анти-VEGF белков у мышей и последующей визуализации и фенотипическому анализу указанных животных.

Пример 9.1. Экспрессия *in vivo* и визуализация анти-VEGF белков, ранибизумаба и бевацизумаба у мышей

[0746] Оценивали биологическую переносимость и/или воздействие композиций,

содержащих анти-VEGF белки, описанные в данном документе, включая измерение уровней анти-VEGF в СМЖ и сыворотке, после внутрикохlearной доставки частиц гAAV, как описано в данном документе, содержащих конструкции, кодирующие антиVEGF. Частицы гAAVAnc80-ранибизумаб-PC или частицы гAAVAnc80-бевацизумаб-PC (как описано в примере 1) вводили мышам P30 ДТ CBA/CaJ). Краткое описание групп исследования 1 можно найти в таблице 3. Также было проведено дополнительное исследование (называемое в данном документе «исследованием 2»), описанное в данном документе, результаты которого представлены ниже, описание групп исследования можно найти в таблице 4. В этих исследованиях собраны данные, относящиеся к хирургическому введению, трансдукции частиц гAAV и последующей экспрессии и воздействию секретируемых анти-VEGF белков. Эти результаты обобщены ниже, а их подробное описание приведено на **фиг. 17-26**. В этих исследованиях частицы гAAVAnc80-ранибизумаб-PC или частицы гAAVAnc80-бевацизумаб-PC (как описано в примере 1) вводили посредством односторонней внутрикохlearной инъекции через мембрану круглого окна с фенестрацией заднего полукружного канала (как описано в данном документе). Животным в контрольной группе вводили буферный раствор состава.

[0747] Мышей CBA/CaJ дикого типа анестезировали для подготовки к введению описанных в данном документе композиций. Были приготовлены контрольные несущие среды, частицы гAAVAnc80-ранибизумаб-PC или частицы гAAVAnc80-бевацизумаб-PC (как описано в примере 1) и введены во внутреннее ухо мыши через мембрану круглого окна. Введение частиц гAAV выполняли в следующие этапы: А) преаурикулярный разрез для обнажения улиткового пузыря, В) стеклянные микропипетки (№ по каталогу 4878 - WPI), вытягиваемые с помощью съемника микропипеток (№ по каталогу P87 - инструменты Sutter) до конечного наружного диаметра около 10 мкм использовали для ручной доставки (микропипетки, удерживаемые микроманипулятором Nanoliter 2000 – WPI) композиций, содержащих частицы гAAV, в барабанную лестницу, что обеспечивает доступ к клеткам внутреннего уха, С) 1 мкл композиции, описанной в данном документе в подходящей концентрации в подходящем буфере (описанный в примере 1, частицы гAAVAnc80-ранибизумаб-PC в количестве приблизительно $1,4 \times 10^{10}$ г/кг на улитку или частицы гAAVAnc80-бевацизумаб-PC в количестве приблизительно $1,2 \times 10^{10}$ г/кг на улитку; каждый был разведен в $1 \times \text{ФСБ}$ с плюроновой кислотой F68) вводили в каждую исследуемую улитку со скоростью высвобождения 0,3 мкл/мин (контроль осуществляли контроллером микроинъекций MICRO4 - WPI). Имитационные операции выполняли, как указано выше, с несущей средой в качестве отрицательного контроля. Мышам давали возможность

восстановиться после операции без дополнительного вмешательства. Через 5 недель после инъекции животных умерщвляли, собирали образцы спинномозговой жидкости (СМЖ), образцы сыворотки и срезы внутреннего уха для иммунофлуоресцентного анализа.

Таблица 3. Распределение по группам в исследовании 1

Группа	Количество животных*	Исследуемый препарат	Концентрация (векторный геном [вг]/мл)	Доза (вг/улитка)	Период выживаемости
1	10	Частицы гAAV Anc80-ранибизумаб-PC	1,4E13	1,4E10	4-5 недель
2	10	Частицы гAAV Anc80-бевацизумаб-PC	1,2E13	1,2E10	4-5 недель
3**	10	Несущая среда	н/п	н/п	4-5 недель

*Комбинированные группы, самцы и самки (от 4 до 6 самцов в группе).

**Неинъекцированные контралатеральные уши из контрольной группы с применением несущей среды используют в качестве гистологического контроля. Сокращения: н/п = неприменимо.

[0748] Для оценки воздействия анти-VEGF белка в результате трансдукции внутреннего уха частицами гAAV, как описано в данном документе (частицы гAAV Anc80-анти-VEGF), кровь и спинномозговую жидкость собирали по завершении через 4–5 недель после внутрикохlearной доставки, а уровни анти-VEGF белка в СМЖ и сыворотке измеряли с помощью иммуноанализа MSD (например, как описано в примере 7). Уровни растворимого анти-VEGF белка (ранибизумаб или бевацизумаб) в СМЖ измеряли в диапазоне 2,71-19,29 нг/мл. После сбора этих жидкостей мышам проводили транскардиальную перфузию, собирали улитки и фиксировали путем погружения для гистологической оценки. Образцы улитки были декальцинировали и подвергали микродиссекции. Тотальные препараты и поперечные срезы иссеченного органа корти окрашивали анти-ранибизумабом (Abscam, ab168684-25UG, mAb) для определения трансгенной экспрессии конструкций, как описано в настоящем документе, и окрашивание анти-фаллоидином (Thermo Fisher A12381) использовали для определения характеристик различных типов клеток внутреннего уха

(**фиг. 17**) и окрашивание анти-миозином V β использовали для мечения волосковых клеток (изображено на **фиг. 18** и количественно определено на **фиг. 20**). Половину образцов также окрашивали анти-Sox2 для мечения поддерживающих клеток, а другую половину - анти-нейрофиламентом 200 для мечения проекций нейронов (**фиг. 19**). Конфокальный анализ иммуноокрашенной ткани использовали для определения эффективности трансдукции/экспрессии анти-VEGF и выживаемости клеток (**фиг. 20 и 21**).

[0749] Экспрессию анти-VEGF белка оценивали по внешнему виду сигнала, а не по его интенсивности. Не желая быть связанными какой-либо конкретной теорией, одной из причин этого может быть то, что поликлональное вторичное антитело потенциально может связывать большее количество эпитопов гуманизированного мышинового антитела бевацизумаб, когда оно конъюгировано с мышиним моноклональным первичным антителом к ранибизумабу (MmAb, описанным выше) по сравнению с соответствующим меньшим по размеру гуманизированным мышиним антителом ранибизумаб, когда оно конъюгировано с моноклональным первичным антителом к ранибизумабу. Внутренние волосковые клетки надежно экспрессировали трансген в большинстве улиток (17 из 19 ушей), получавших частицы гAAVAnc80-ранибизумаб-PC или частицы гAAVAnc80-бевацизумаб-PC (как описано в примере 1, результаты представлены на **ФИГ. 17** и количественно определены на **ФИГ. 21**). Из этих 17 улиток 14 также продемонстрировали экспрессию в подмножестве ОНС и/или неволосковых клеток. Не было обнаружено существенной разницы в идентичности клеток и характере экспрессии между ушами, в которые вводили частицы гAAVAnc80-ранибизумаб-PC, по сравнению с ушами, в которые вводили частицы гAAVAnc80-бевацизумаб-PC.

[0750] Было получено подтверждение того, что эта экспрессия в тканях улитки приводит к продукции и секреции анти-VEGF белка (ранибизумаб или бевацизумаб). Образцы СМЖ (образцы из большой цистерны) и сыворотки собирали и анализировали у животных (**фиг. 23 и 24**). Концентрации анти-VEGF белка в перилимфе также можно измерить, чтобы лучше понять соотношение воздействия анти-VEGF белка между перилимфой и СМЖ. Сбор образцов перилимфы у мышей может представлять техническую сложность. В настоящем примере был собран один образец перилимфы. Анти-VEGF белок (ранибизумаб или бевацизумаб) был обнаружен в СМЖ животных, которым вводили частицы гAAV, по сравнению с отсутствием обнаружения у контрольных животных, которым вводили несущую среду (**фиг. 24**). Обнаружение секретируемого анти-VEGF белка с помощью MSD анализа было ограничено качественным сравнением между ранибизумабом и бевацизумабом, благодаря использованию аналогичного

поликлонального вторичного антитела, используемого для обнаружения экспрессии в тканях улитки (как описано выше), при этом более сильный сигнал наблюдается в образцах из ушей, в которые вводили частицы гAAV_{Anc80}-бевацизумаб-PC, из-за большей доступности эпитопов. Не желая быть связанным какой-либо конкретной теорией, четкое обнаружение анти-VEGF белка в СМЖ может быть связано с сообщением между перилимфой и СМЖ у этого вида через состоятельный акведук улитки.

[0751] Сыворотку мышей оценивали на наличие анти-VEGF белка (ранибизумаб) с помощью анализа MSD с применением антитела с клеевой цепью (pAb), которое выявляет ранибизумаб (описано выше и в примере 7). По сравнению с животными, которым вводили несущую среду, мыши, которым внутрикохлеарно доставляли частицы гAAV-ранибизумаб-PC, демонстрировали более высокие уровни анти-VEGF (белка ранибизумаб) в сыворотке через 4-5 недель после доставки (**фиг. 23**).

[0752] Можно оценить сыворотку крови мышей, которым внутрикохлеарно доставлялись частицы гAAV-ранибизумаб, гAAV-ранибизумаб-GFP, гAAV-бевацизумаб-PC, гAAV-бевацизумаб, гAAV-бевацизумаб-GFP, гAAV-афлиберцепт-PC или гAAV-афлиберцепт (например, содержащие ранибизумаб, бевацизумаб или афлиберцепт).

[0753] Исследование 2 также проводили с использованием тех же параметров: например, линии мышей, возраста, капсида гAAV, конструкции, кодирующей ранибизумаб, и процедуры внутрикохлеарного введения, чтобы рассмотреть новые данные, указывающие на возможные хирургические проблемы. В исследовании использовали частицы гAAV_{Anc80}-ранибизумаб-PC (как описано в примере 1), так как в некоторых вариантах осуществления ранибизумаб может иметь другие характеристики по сравнению с бевацизумабом, например, более высокую способность к связыванию и более высокую аффинность связывания, отсутствие домена Fc и меньшую молекулярную массу. Частицы гAAV_{Anc80}-ранибизумаб-PC (как описано в примере 1) вводили в количестве 1,4E10 гв/улитку посредством односторонней внутрикохлеарной инъекции через мембрану круглого окна с фенестрацией заднего полукружного канала (как описано в данном документе). Неинъецированные уши мышей, которым вводили несущую среду, выступали в качестве контроля. По окончании исследования животных подвергали транскардиальной перфузии и собирали улитки, декальцинировали и микропрепарировали для визуализации с помощью конфокальной микроскопии с использованием следующих меток: антитело к ранибизумабу (mAb) для обнаружения экспрессии трансгена; анти-миозина VIIa для мечения волосковых клеток; и анти-Tuj1 для мечения проекций кохлеарных нервных

волокон (*например*, радиальных нервных волокон).

Таблица 4. Распределение по группам в исследовании 2

Группа	Количество животных *	Исследуемый препарат	Концентрация (векторный геном [вг]/мл)	Доза (вг/улитка)	Период выживаемости
1	3	Частица rAAV-ранибизумаб-PC	1,4E13	1,4E10	4 недели
2	2	Неинъецированный	н/п	н/п	4 недели*

* С даты операции проведения замещающей операции в зависимости от возраста мышей (имитация операции не проводилась). Сокращения: н/п = неприменимо.

[0754] Гистология сенсорного эпителия улитки в этом исследовании продемонстрировала широкое распределение экспрессии анти-VEGF белка (ранибизумаб) по длине улитки (**фиг. 22**) в нескольких типах клеток, включая внутренние и наружные волосковые клетки, латеральные поддерживающие клетки и интердентальные клетки спирального лимба. В целом волосковые клетки присутствовали в проанализированных областях улитки, за исключением того, что некоторая потеря ИНС наблюдалась в самой апикальной области улитки мыши 1.

Пример 9.2. Фенотипический анализ доставки и продукции ранибизумаба и бевацизумаба *in vivo* у мышей

[0755] Частицы rAAV-антиVEGF, как описано в данном документе, оценивали на предмет улитковой переносимости у мышей. В рамках исследования, проведенного для оценки трансдукции и последующей секреции белка у мышей после внутрикхлеарной доставки иллюстративных частиц rAAVAnc80-ранибизумаб-PC или частиц rAAVAnc80-бевацизумаб-PC (как описано в примере 1), также оценивали общую переносимость, слуховую и кохлеарную функцию, а также выживаемость волосковых клеток для оценки улитковой переносимости хирургического введения и экспрессии трансгена. В течение 4-5 недель после внутрикхлеарной доставки не было обнаружено каких-либо негативных изменений в массе тела или оценке состояния тела, за исключением одного животного, которое умерло через 1 неделю после доставки по неустановленной причине (отсутствие хирургических осложнений или отклонений от нормы при наблюдении за состоянием

здоровья). Никаких признаков повреждения вестибулярного аппарата, о чем свидетельствуют круговые движения или покачивание головой, обнаружено не было.

[0756] Оценку слуховой функции с помощью ABR проводили до операции и через 4–5 недель после операции (непосредственно перед умерщвлением). Пороговые сдвиги наблюдались в группах, получавших частицы гAAVAnc80-ранибизумаб-PC или частицы гAAVAnc80-бевацизумаб-PC, а также в группе, получавшей несущую среду. Пороговые сдвиги были одинаковой величины в разных группах, что свидетельствует о потенциальном повреждении улитки вследствие хирургической процедуры, а не из-за экспрессии трансгена (**фиг. 25**).

[0757] В соответствии с функциональными оценками (ABR; **фиг. 25**), потеря волосковых клеток была обнаружена в группах, получавших частицы гAAVAnc80-ранибизумаб-PC или частицы гAAVAnc80-бевацизумаб-PC, а также в группе, получавшей несущую среду, но не в неинъецированных (контралатеральных) контрольных ушах. Повреждение базилярной мембраны в основании улитки было обнаружено в 16 из 19 ушей, в которые вводили частицы гAAVAnc80-анти-VEGF, и в 9 из 10 ушей, в которые вводили несущую среду, а последующая потеря наружных волосковых клеток в этих поврежденных областях была заметной при 16 и 32 кГц (**фиг. 18**). В целом потеря ИС не была значительной; спорадическая потеря ИС была обнаружена только в частотной области 8 кГц в 2 из 19 ушей, в которые вводили частицы гAAVAnc80-анти-VEGF (**фиг. 18**). Хотя способ введения привел к повреждению волосковых клеток в данном конкретном исследовании (далее «Исследование 1»), согласованность между функциональными оценками и выживаемостью клеток в разных ушах, независимо от введения частицы гAAVAnc80-анти-VEGF или несущей среды, свидетельствует о том, что потеря клеток могла быть вызвана хирургической процедурой, а не токсичностью капсида гAAV, экспрессией трансгена или последующей секрецией белка.

[0758] С учетом полученных данных о том, что хирургическое вмешательство может привести к потере клеток, было проведено исследование 2. Это исследование не показало систематического повреждения базилярной мембраны и последующей потери ОНС, а только спорадическую потерю на крайней вершине и основании через 4 недели после внутрикохlearной доставки частиц гAAVAnc80-ранибизумаб-PC (как описано в примере 1) (**фиг. 22**). В соответствии с качественной оценкой общей выживаемости волосковых клеток в соответствующих областях оценка функции улитки (DPOAE) и слуховой функции (ABR) выявила нормальные пороговые значения через 4 недели после введения по сравнению с контрольной группой, в которой инъекции не проводились (**фиг. 26, панели (А) и (В)**).

[0759] Объединенные данные показывают, что доставка частиц гAAV Anc80-анти-VEGF (таких как частицы гAAV Anc80-ранибизумаб-РС или частицы гAAV Anc80-бевацизумаб-РС (как описано в примере 1) при введении мышам приводила к экспрессии трансгена в нескольких типах клеток, включая как волосковые клетки, так и различные поддерживающие клетки, а также обнаружение секретируемого анти-VEGF белка (ранибизумаб или бевацизумаб) в СМЖ. У мышей анти-VEGF белок присутствовал в СМЖ, не желая быть связанными какой-либо конкретной теорией, потенциально это может происходить через активный обмен жидкостью между перилимфой и СМЖ через состоятельный акедук улитки у этого вида. Эти результаты отражают 1) устойчивую экспрессию анти-VEGF белка в клетках улитки и 2) обнаружение секретируемого анти-VEGF белка в СМЖ, что способствует продвижению программ на более анатомически релевантные и переводимые виды, такие как отличные от человека приматы.

Пример 10. Фенотипический анализ трансгенной экспрессии анти-VEGF белка, кодирующего мРНК, и экспрессии белка в мышинных моделях вестибулярной шванномы (ВШ)

[0760] Настоящий пример относится к анализу фенотипов, связанных с ВШ, в мышинных моделях (*например*, модели, как описано в Chen et al., Nature Protocols 2019, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки). Мышей модели подготавливают, как описано в работе Chen et al., мышам дают восстановиться после операции в течение соответствующего периода времени (*например*, приблизительно 1 неделя), а затем анестезируют для подготовки к введению композиций, описанных в настоящем документе. Были приготовлены имитационные частицы гAAV или конструкции гAAV (например, такие, как показаны в примере 1), инкапсулированные капсидами Anc80, и введены во внутреннее ухо мыши через мембрану круглого окна. Введение частиц гAAV-анти-VEGF выполняют в следующие этапы: А) преаурикулярный разрез для обнажения улиткового пузыря, В) стеклянные микропипетки (например, № по каталогу 4878 - WPI), вытягиваемые с помощью съемника микропипеток (например, № по каталогу P87 - инструменты Sutter) до конечного наружного диаметра ~ 10 мкм используют для ручной доставки (например, микропипетки, удерживаемые микроманипулятором Nanoliter 2000 – WPI) композиций, содержащих частицы гAAV, в барабанную лестницу, что обеспечивает доступ к клеткам внутреннего уха, С) приблизительно 1 мкл композиции, описанной в данном документе (*например*, конструкции гAAV, описанные в данном документе, приблизительно от $4,5 \times 10^9$ до 5×10^{10} вг/улитку в 1хФСБ с плурониловой кислотой F68)

вводят в каждую тестируемую улитку со скоростью высвобождения 0,3 мкл/мин (например, контролируемой контроллером микроинъекций MICRO4 - WPI). Имитационные операции выполняют, как указано выше, с несущей средой в качестве отрицательного контроля. Мышам дают восстановиться после операции без дополнительного вмешательства.

[0761] Через соответствующие промежутки времени после операции (*например*, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 7 недель и 8 недель) мышинные модели ВШ, подвергшиеся одностороннему или двустороннему введению композиции или имитационным инъекциям, анестезируются пентобарбиталом натрия (*например*, 35 мг/кг), вводимым внутривентриально. Затем мышей помещают и содержат в держателе для головы в заземленной и акустически и электрически изолированном помещении для испытаний. Систему обнаружения вызванных потенциалов (*например*, Smart EP 3.90, Intelligent Hearing Systems, Майами, штат Флорида, США) используют для измерения порогов акустических стволовых вызванных потенциалов (ABR) у мышей. Щелчки, а также всплески тонов частотой 8, 16 и 32 кГц различной интенсивности (*например*, от 10 до 130 дБ SPL) используют для вызова ABR у подопытных мышей. Сигналы ответов регистрируют с помощью подкожного игольчатого электрода, вводимого вентролатерально в уши мышей. Этот пример подтверждает, что введение иллюстративных конструкций, как описано в данном документе (*например*, как описано в примере 1), может уменьшить и/или предотвратить симптомы ВШ, дальнейший анализ может помочь в определении точного временного окна введения и того, как экспрессия анти-VEGF белка действует для подавления симптомов ВШ. Результаты представлены в виде изображения ABR, и подопытные животные и/или уши сравнивают с контролем, который может включать неинъектированных животных или неинъектированные уши. Улучшение показателей ABR наблюдается у подопытных ушей по сравнению с контрольными ушами или у подопытных животных по сравнению с контрольными животными. Улучшение ответов на стимулы также могут наблюдаться в ушах, в которые не выполняли инъекции из-за перехода от уха, в которое выполняли инъекцию, к уху, в которое не выполняли инъекцию.

[0762] Через соответствующие промежутки времени после операции (*например*, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 7 недель и 8 недель) мышинные модели ВШ, подвергшиеся одностороннему или двустороннему введению композиции или имитационным инъекциям, анестезируются (*например*, пентобарбиталом натрия (35 мг/кг), вводимым внутривентриально). Затем мышей умерщвляют и собирают опухоли ВШ. Сравнивают объем опухолей, характер транскрипции, белковый состав и/или гистологию. Подопытные мыши, которым вводили иллюстративные композиции, как описано в данном

документе, демонстрируют уменьшенный объем опухоли, измененный характер транскрипции, измененный белковый состав и/или измененную гистологию по сравнению с контрольными мышами модели ВШ, которым не проводили инъекции.

[0763] Чтобы оценить вероятность токсичности для внутреннего уха, после общего осмотра улитку можно обработать, препарировать и окрасить, а также можно провести анализ цитокохлеогаммы для оценки потери ИНС и/или ОНС. Противоположная улитка/ухо может быть препарирована для гистопатологии среднего и внутреннего уха и микроскопической оценки (*например*, сертифицированным патологоанатомом) для оценки любых макро- и микроскопических поражений.

Пример 11. Анализ трансгенной экспрессии мРНК анти-VEGF и экспрессии белка в животных моделях отличных от человека приматов

[0764] В настоящем примере представлены исследования частиц гAAVAnc80-анти-VEGF *in vivo* на отличных от человека приматах (NHP). Эти исследования могут определять, среди прочего, переносимость, токсикологию и фенотипический ответ после введения способов и/или композиций, как описано в настоящем документе. Для этой цели используются соответствующие модели NHP (*например*, яванского макака, также известный как макак-крабоед), поскольку физиологическое сходство внутреннего уха между NHP и людьми более выражено, чем у мышинных моделей. Макак модели NHP имеет морфологию внутреннего уха, которая в значительной степени является репрезентативной для морфологии внутреннего уха приматов, где отсутствие состоятельного водопровода улитки облегчает предсказуемую и количественную оценку объема инъекций, вводимых в перилимфу. По причине относительно узкого диаметра наружного слухового прохода у NHP по сравнению с людьми требуемый хирургический доступ для этой модели животных является более инвазивным (вход через сосцевидный отросток/лицевой карман, а не через наружный слуховой проход). Не желая привязываться к какой-либо конкретной теории, по вышеуказанным причинам этот подход может привести к завышению оценок ожидаемой кондуктивной потери, хирургической травмы или того и другого. Несмотря на то, что улитка макака имеет примерно одну треть от общего объема внутреннего уха человека, она анатомически похожа, и предлагаемый процесс доставки лекарственного средства (*например*, инъекция через мембрану круглого окна) сам по себе осуществляется способом, описанным ранее. Для анализа и исследования внутрикохлеарного введения частиц гAAV-анти-VEGF, как описано в настоящем документе, макака представляет собой наиболее

подходящую анатомически правильную животную модель для оценки как безопасности, так и переносимости, а также дозы частиц гAAV, необходимой для эффективных уровней воздействия анти-VEGF белка в непосредственной близости от ВШ и/или родственных опухолей.

Пример 11.1. Экспрессия in vivo и анализ анти-VEGF белка ранибизумаба у NHP

[0765] У NHP частицы гAAV-анти-VEGF, как описано в данном документе (например, гAAVAnc80-анти-VEGF), доставляли следующим образом: делали постаурикулярный разрез и проводили рассечение мягких тканей до уровня надкостницы. Надкостницу рассекали и приподнимали, чтобы обнажить сосцевидный отросток. Кортикальную мастоидэктомия выполняли с помощью комбинации высокоскоростной резки и алмазных боров. Затем открывали лицевой карман, что позволяло адекватно визуализировать круглое и овальное окна (OW). Фенестрацию основания стремени в OW выполняли с помощью иглы Розена. Как и в других моделях, фенестрация позволяет вводить больший объем без повреждения внутреннего уха; кроме того, создание отверстия позволяет раствору, содержащему частицы гAAV-анти-VEGF, протечь к верхушке улитки. Тридцать мкл раствора, содержащего вирусные частицы (приблизительно от 40 до 50% от общего объема внутреннего уха), доставляли через мембрану круглого окна со скоростью 30 мкл/мин.

[0766] Композиции и способы, описанные в данном документе, оценивали на предмет местной и системной переносимости с использованием одновременного двустороннего внутрикохлеарного введения частиц гAAVAnc80-ранибизумаб (как описано в примере 1) у NHP (яванского макака) с последующим 2-месячным или 6-месячным периодом восстановления. Помимо прочего, эта оценка: 1) продемонстрировала местную и системную переносимость и 2) позволила оценить уровни экспрессии анти-VEGF белка в перилимфе, СМЖ, сыворотке и других тканях после внутрикохлеарного введения частицы гAAVAnc80-анти-VEGF. Использовались группы как с низкой, так и с высокой дозой. Группы с низкой и высокой дозой были основаны на предыдущих платформенных и поддерживающих исследованиях у NHP, в которых дозы были близки к соответствующей концентрации более высокой дозы ($1,0E13$ гв/мл, что соответствует $3,0E11$ гв/улитку; с человеческим эквивалентом $9,0E11$ вг/улитку), не ассоциировались с патологией волосковых клеток NHP, в то время как более высокая концентрация ($3,7E13$ вг/мл, что соответствует $1,1E12$ вг/улитку; человеческий эквивалент $3,3E12$ вг/улитку) ассоциировалась с потенциально связанной с капсидом патологией в волосковых клетках некоторых животных. Проведенные исследования, представленные в настоящем

документе, включали дополнительную группу с высокими дозами и группу с применением несущей среды с основной целью сбора перилимфы для обеспечения доступности образцов для измерения уровней анти-VEGF белка (например, с помощью MSD); эти отдельные группы были необходимы, поскольку сбор перилимфы почти всегда повреждает окружающую улитку.

[0767] Результаты, полученные в этих экспериментах, показывают, что анти-VEGF белок (ранибизумаб) был обнаружен в перилимфе NHP. Анти-VEGF белок не был обнаружен в перилимфе контрольной группы NHP, которой вводили несущую среду, и анти-VEGF белок не был обнаружен в терминальной СМЖ любого NHP, независимо от периода после введения (2 или 6 месяцев).

[0768] **Фиг. 27** демонстрирует вычислительную модель, которая включает уровни воздействия в перилимфе для оценки свойств диффузии от внутреннего уха к типичному участку ВШ. Компьютерное моделирование (как показано на **фиг. 27**) диффузии анти-VEGF белка через внутренний слуховой проход позволило спрогнозировать, что уровень анти-VEGF в перилимфе превышал биологически активную пороговую концентрацию (IC 50 ранибизумаба) в пределах заявленного диапазона ранних локализаций ВШ. Концентрация, необходимая для ингибирования биологической активности VEGF-A на 50% в анализе клеточной пролиферации *in vitro*, составляет от 11 до 27 нг/мл, как описано в Genentech 2017, полностью включенной в данный документ посредством ссылки.

[0769] Уровни анти-VEGF белка в сыворотке оценивали у NHP, и обнаруженный уровень анти-VEGF белка был минимальным или необнаруживаемым у всех NHP. Анти-VEGF белок также не был обнаружен ни в одном лизате тканей, не относящихся к улиткам NHP, включая печень, селезенку, ствол мозга, слуховую зону коры головного мозга слева и справа, подчелюстной лимфатический узел слева и справа.

[0770] Учитывая клинические данные, демонстрирующие эффективность системного анти-VEGF белка в контроле роста опухоли ВШ и облегчении симптомов опухоли ВШ, эти эксперименты показали возможность создания депо анти-VEGF белка во внутреннем ухе для целей потенциального уменьшения размера опухоли и/или контроля роста опухоли и ее последствий путем местного воздействия анти-VEGF белков, тем самым ограничивая нежелательные эффекты, связанные с повторным системным введением анти-VEGF белка.

Пример 12. Фенотипический анализ NHP, которым осуществляли доставку rAAV_{anc80}-ранибизумаба

[0771] Как описано выше, было проведено исследование воздействия и переносимости у NHP (яванских макак) с использованием частиц гAAV Anc80-ранибизумаб (как описано в примере 1), в которых частицы доставляли в улитку с обеих сторон, для оценки местных и системных эффектов частиц гAAV Anc80-анти-VEGF у NHP. Помимо прочего, это исследование позволило получить данные о кохлеарной переносимости (серийные измерения АВР до 6 месяцев после введения; цитокохлеограммы через 2 и 6 месяцев после введения; и гистопатология уха через 2 и 6 месяцев после введения).

[0772] Двустороннее внутрикохлеарное введение частиц гAAV Anc80-ранибизумаб (как описано в примере 1) с двумя иллюстративными дозами (доза 1 и доза 2) или несущей среды выполняли с применением хирургического доступа через сосцевидный отросток/лицевой карман для получения доступа к круглым и овальным окнам, как описано выше. Доза 1 была ниже, чем доза 2.

[0773] После введения не было задокументировано значимых клинических находок, связанных с внутрикохлеарным введением и/или исследуемой частицей гAAV Anc80-анти-VEGF. Считалось, что незначительные неврологические признаки связаны с хирургическими манипуляциями, которые потенциально могут повлиять на вестибулярную систему, и NHP восстановились без медицинского вмешательства. В целом, клинические наблюдения для всех NHP с 2- и 6-месячным восстановлением в основном были ожидаемыми временными находками после операции на внутреннем ухе.

Пример 13. Введение у человека

[0774] В этом примере описано лечение субъекта с потерей слуха и/или дополнительными симптомами, ассоциированными с ВШ, возникающими либо случайно, либо в связи с синдромом (*например*, нейрофиброматозом-2).

[0775] У людей можно использовать менее инвазивный подход для доставки агентов, как описано в данном документе, по сравнению с подходом, используемым в модельных организмах, как описано выше, *например*, через наружный слуховой проход; как и в некоторых вариантах осуществления, это более практично, поскольку соответствующие структуры у людей имеют относительно большой размер даже по состоянию на момент рождения. Вкратце, описанный в данном документе способ клинического введения может включать трансканальную поисковую тимпанотомию и лазерную микростапедотомию (с использованием титанилфосфата калия [КТР] или отологического лазера СО₂ для создания небольшого вентиляционного отверстия [приблизительно 0,25 мм] в основании стремени),

с последующим введением через круглое окно около 0,09 мл (или около 90 мкл, приблизительно 40-50% от общего объема внутреннего уха) раствора, содержащего частицы гAAV-анти-VEGF, как описано в данном документе, через мембрану круглого окна в течение трехминутного периода. Как и в доклинических и кадаверных моделях, вентиляция служит для предотвращения потенциально пагубного повышения внутрилабиринтного давления. Дополнительная информация относительно процедуры клинического введения и устройства доставки может быть найдена в настоящем описании.

[0776] У пациента может быть диагностирована односторонняя или двусторонняя ВШ (например, по данным МРТ). Процедура клинического введения может представлять собой трансканальную диагностическую тимпанотомию и лазерную микростапедотомию с последующей инъекцией через круглое окно для доставки соответствующего объема раствора, содержащего частицы гAAV-анти-VEGF, как описано в данном документе, в соответствующем титре через круглое окно в течение короткого периода времени. Перед операцией можно определить оперируемое ухо и поставить над ухом несмываемую метку для подтверждения в соответствии с требованиями учреждения. Наличие частицы гAAV, как описано в настоящем документе, может быть подтверждено до проведения анестезии. После индукции общей анестезией испытуемых укладывают в положение лежа на спине с повернутой набок головой и обращенным вверх ухом, подлежащим оперативному вмешательству. Ухо можно обработать бетадином и покрыть обычным способом. С помощью операционного микроскопа или эндоскопа выполняют четырехквadrантную блокаду наружного слухового прохода под анестезией (например, 1% лидокаином с адреналином). Формируют задний тимпано-меатальный лоскут и входят в среднее ухо для обнажения овального и круглого окна. Для этого может потребоваться удаление небольшого количества кости в месте соединения костного канала и барабанной перепонки с помощью микрокюретки или сверла. С помощью соответствующего лазера (например, отологического лазера КТР или CO₂) в основании стремени создается небольшое отверстие (например, с размером приблизительно 0,25 мм). Такое отверстие может служить вентиляционным отверстием во время инъекции для предотвращения потенциально вредного повышения внутрилабиринтного давления. Затем катетер для инъекций можно ввести через мембрану круглого окна на соответствующую глубину (например, не более 1 мм), определяемую стопором возле кончика инъекционного устройства. Для обнажения круглого окна может потребоваться удаление псевдомембраны или выступа нависающей кости. Устройство доставки можно удерживать на месте, пока проводится инстилляционная соответствующего объема раствора. После удаления катетера проводят пломбирование

аутокровью или помещают лоскут ткани и/или каплю герметика (например, гиалуронат натрия, например, Healon®) поверх мембраны круглого окна и основания стремени, чтобы создать функциональное уплотнение обоих окон, пока происходит биологическое заживление в течение следующих 24-48 часов. Затем тимпано-меатальный лоскут возвращают в его анатомическое положение и фиксируют на месте с помощью пропитанной антибиотиком рассасывающейся желатиновой губки.

[0777] Через соответствующие промежутки времени субъект может пройти визуализационный анализ в рамках последующего наблюдения (например, МРТ-анализ) для измерения объема опухоли и/или скорости роста опухоли. Субъекты, которых лечили иллюстративными способами и/или композициями, описанными в данном документе, могут демонстрировать уменьшенный объем опухоли и/или сниженную скорость роста опухоли по сравнению с субъектами, которых не лечили иллюстративными способами и/или композициями, описанными в данном документе.

[0778] Для доставки используется стерильное одноразовое устройство доставки. Такое устройство предназначено для обеспечения безопасной и эффективной доставки частиц-кандидатов гAAV-анти-VEGF, описанных в данном документе, через мембрану круглого окна в улитку. Устройство доставки предназначено для применения в ходе доставки продуктов-кандидатов генной терапии, описанных в данном документе, часто в сочетании с внутрикохлеарным путем введения. Может быть разработано устройство одноразового применения для доставки исследуемых препаратов в перилимфу внутреннего уха через мембрану круглого окна с вентиляционным отверстием, расположенным в основании стремени; форм-фактор устройства оптимизирует доступ к мембране круглого окна через наружный слуховой проход. Индивидуальное устройство имеет преимущества по сравнению с коммерчески доступными материалами как в отношении безопасности, так и потенциальной эффективности терапевтического агента, поскольку такое устройство специально разработано для этого внутрикохлеарного пути введения (**фиг. 4**). Определенные элементы конструкции устройства включают, но не ограничиваются ими: поддержание стерильности вводимой жидкости; минимизацию попадания пузырьков воздуха во внутреннее ухо; возможность точной доставки небольших объемов с регулируемой скоростью потока (в сочетании с использованием стандартного насоса); возможность визуализации мембраны круглого окна и доставки через наружный слуховой проход хирургом; минимизацию повреждения мембраны круглого окна или структур улитки, расположенных за пределами мембраны круглого окна; и/или минимизацию вытекания вводимого препарата через мембрану круглого окна.

ИЛЛЮСТРАТИВНЫЕ ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

[0779] Вариант осуществления 1. Конструкция, содержащая кодирующую последовательность, функционально связанную с промотором, причем кодирующая последовательность кодирует агент, связывающий фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) или его часть

[0780] Вариант осуществления 2. Конструкция по варианту осуществления 1, в которой промотор представляет собой индуцируемый промотор, конститутивный промотор или тканеспецифический промотор.

[0781] Вариант осуществления 3. Конструкция по варианту осуществления 1 или 2, в которой промотор представляет собой промотор CAG, промотор CBA, промотор CMV или промотор CB7.

[0782] Вариант осуществления 4. Конструкция по любому из вариантов осуществления 1–3, в которой промотор содержит последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 49 и/или SEQ ID NO: 65.

[0783] Вариант осуществления 5. Конструкция по любому из вариантов осуществления 1–4, в которой кодирующая последовательность представляет собой или включает кодирующую последовательность примата.

[0784] Вариант осуществления 6. Конструкция по любому из вариантов осуществления 1–5, в которой VEGF-связывающий агент или его часть представляет собой VEGF-связывающий агент примата.

[0785] Вариант осуществления 7. Конструкция по любому из вариантов осуществления 1–4, в которой кодирующая последовательность представляет собой или включает кодирующую последовательность человека.

[0786] Вариант осуществления 8. Конструкция по любому из вариантов осуществления 1–4 или 6, в которой VEGF-связывающий агент представляет собой или включает VEGF-связывающий агент человека.

[0787] Вариант осуществления 9. Конструкции по любому из вариантов осуществления 1–4, в которой кодирующая последовательность представляет собой или включает сконструированную кодирующую последовательность.

[0788] Вариант осуществления 10. Конструкция по любому из вариантов

осуществления 1–4 или 9, в которой VEGF-связывающий агент представляет собой или включает гуманизированный VEGF-связывающий агент.

[0789] Вариант осуществления 11. Конструкция по любому из вариантов осуществления 1–10, в которой VEGF-связывающий агент способен связываться с по меньшей мере одним белком VEGF.

[0790] Вариант осуществления 12. Конструкция по варианту осуществления 11, в которой по меньшей мере один белок VEGF представляет собой VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D или их комбинацию.

[0791] Вариант осуществления 13. Конструкция по варианту осуществления 11, в которой по меньшей мере один белок VEGF представляет собой VEGF-A.

[0792] Вариант осуществления 14. Конструкция по любому из вариантов осуществления 1–13, в которой VEGF-связывающий агент содержит по меньшей мере один полипептид.

[0793] Вариант осуществления 15. Конструкция по любому из вариантов осуществления 1–14, в которой VEGF-связывающий агент представляет собой или включает антитело или его фрагмент.

[0794] Вариант осуществления 16. Конструкция по варианту осуществления 15, в которой фрагмент антитела представляет собой фрагмент Fab, фрагмент Fab', фрагмент F(ab')₂, фрагмент Fd, фрагмент Fd', определяющую комплементарную область (CDR), одноцепочечный Fv или домен Fc.

[0795] Вариант осуществления 17. Конструкция по любому из вариантов осуществления 1–15, в которой VEGF-связывающий агент представляет собой или включает тяжелую цепь иммуноглобулина, легкую цепь иммуноглобулина или их комбинацию.

[0796] Вариант осуществления 18. Конструкция по любому из вариантов осуществления 1–15 или 17, в которой VEGF-связывающий агент содержит:

(i) полипептид, содержащий аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 16,

(ii) полипептид, содержащий аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 20, или

(iii) их комбинацию.

[0797] Вариант осуществления 19. Конструкция по варианту осуществления 18, в которой VEGF-связывающий агент представляет собой или включает ранибизумаб.

[0798] Вариант осуществления 20. Конструкция по любому из вариантов осуществления 1–15 или 17–19, в которой кодирующая последовательность включает:

- (i) последовательность нуклеиновой кислоты, включающую SEQ ID NO: 13,
- (ii) последовательность нуклеиновой кислоты, включающую SEQ ID NO: 19, или
- (iii) их комбинацию.

[0799] Вариант осуществления 21. Конструкция по любому из вариантах осуществления 1–20, в которой кодирующая последовательность включает одну или более последовательностей нуклеиновых кислот, каждая из которых кодирует сигнальный пептид.

[0800] Вариант осуществления 22. Конструкция по варианту осуществления 21, в которой по меньшей мере одна последовательность нуклеиновой кислоты кодирует сигнальный пептид интерлейкина 2 (IL2).

[0801] Вариант осуществления 23. Конструкция по любому из вариантов осуществления 1–22, в которой кодирующая последовательность содержит одну или более последовательностей, кодирующих саморасщепляющийся пептид.

[0802] Вариант осуществления 24. Конструкция по варианту осуществления 23, в которой саморасщепляющийся пептид представляет собой пептид 2A вируса *Thosea asigna* (T2A).

[0803] Вариант осуществления 25. Конструкция по любому из вариантов осуществления 1–15 или 17–24, в которой кодирующая последовательность представляет собой или включает последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 21.

[0804] Вариант осуществления 26. Конструкция по любому из вариантов осуществления 1–15 или 17, в которой VEGF-связывающий агент содержит:

- (i) полипептид, содержащий аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 24,
- (ii) полипептид, содержащий аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 25, или
- (iii) их комбинацию.

[0805] Вариант осуществления 27. Конструкция по варианту осуществления 26, в которой VEGF-связывающий агент представляет собой или включает бевацизумаб.

[0806] Вариант осуществления 28. Конструкция по любому из вариантов осуществления 1–15, 17, 26 или 27, в которой кодирующая последовательность включает:

(i) последовательность нуклеиновой кислоты, включающую SEQ ID NO: 108,

(ii) последовательность нуклеиновой кислоты, включающую SEQ ID NO: 109,

или

(iii) их комбинацию.

[0807] Вариант осуществления 29. Конструкция по любому из вариантах осуществления 26–28, в которой кодирующая последовательность включает одну или более последовательностей, каждая из которых кодирует сигнальный пептид.

[0808] Вариант осуществления 30. Конструкция по варианту осуществления 29, в которой по меньшей мере одна последовательность нуклеиновой кислоты кодирует сигнальный пептид PL2.

[0809] Вариант осуществления 31. Конструкция по любому из вариантов осуществления 26–30, в которой кодирующая последовательность содержит одну или более последовательностей, кодирующих саморасщепляющийся пептид.

[0810] Вариант осуществления 32. Конструкция по варианту осуществления 31, в которой саморасщепляющийся пептид представляет собой пептид T2A.

[0811] Вариант осуществления 33. Конструкция по любому из вариантов осуществления 1–15, 17 или 26–32, в которой кодирующая последовательность представляет собой или включает последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 22.

[0812] Вариант осуществления 34. Конструкция по любому из вариантов осуществления 1–15, в которой VEGF-связывающий агент содержит домен Fc.

[0813] Вариант осуществления 35. Конструкция по любому из вариантов осуществления 1–15 или 34, в которой домен Fc содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 111.

[0814] Вариант осуществления 36. Конструкция по любому из вариантов осуществления 1–15, 34 или 35, в которой кодирующая последовательность включает последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 110.

[0815] Вариант осуществления 37. Конструкция по любому из вариантов осуществления 1–15 или 34–36, в которой VEGF-связывающий агент содержит один или более внеклеточных доменов рецептора VEGF.

[0816] Вариант осуществления 38. Конструкция по варианту осуществления 37, в которой один или более внеклеточных доменов рецептора VEGF содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 112.

[0817] Вариант осуществления 39. Конструкция по любому из вариантов осуществления 1–15 или 34–38, в которой VEGF-связывающий агент содержит два внеклеточных домена рецептора VEGF.

[0818] Вариант осуществления 40. Конструкция по любому из вариантах осуществления 34–39, в которой кодирующая последовательность включает одну или более последовательностей нуклеиновых кислот, каждая из которых кодирует сигнальный пептид.

[0819] Вариант осуществления 41. Конструкция по варианту осуществления 40, в которой по меньшей мере одна последовательность нуклеиновой кислоты кодирует сигнальный пептид П2.

[0820] Вариант осуществления 42. Конструкция по любому из вариантов осуществления 1-41, дополнительно содержащая два инвертированных концевых повтора (ITR) AAV, причем два ITR AAV фланкируют кодирующую последовательность и промотор.

[0821] Вариант осуществления 43. Конструкция по варианту осуществления 42, в которой два ITR AAV являются ITR AAV2 или получены из них.

[0822] Вариант осуществления 44. Конструкция по варианту осуществления 42 или 43, в которой два ITR AAV содержат 5'-ITR, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 45 или 47, и 3'-ITR, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 46 или 48.

[0823] Вариант осуществления 45. Конструкция по варианту осуществления 1, причем конструкция содержит последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с любой из SEQ ID NO: 90, 91, 92, 93, 94, 106 или 107.

[0824] Вариант осуществления 46. Конструкция по варианту осуществления 1, причем конструкция содержит последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 95 или 96.

[0825] Вариант осуществления 47. Частица AAV, содержащая конструкцию по любому из вариантов осуществления 1-46.

[0826] Вариант осуществления 48. Частица AAV по варианту осуществления 47, дополнительно содержащая капсид AAV, причем капсид AAV представляет собой капсид AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV-rh8, AAV-rh10, AAV-rh39, AAV-rh43 или Anc80 AAV, или получен из них.

[0827] Вариант осуществления 49. Частица AAV по варианту осуществления 48, в которой капсид AAV представляет собой капсид Anc80 AAV.

[0828] Вариант осуществления 50. Композиция, содержащая конструкцию по любому из вариантов осуществления 1-46.

[0829] Вариант осуществления 51. Композиция, содержащая частицу AAV по любому из вариантов осуществления 47-50.

[0830] Вариант осуществления 52. Композиция по варианту осуществления 51, в которой частица AAV содержит капсид AAV, причем капсид AAV представляет собой капсид AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV-rh8, AAV-rh10, AAV-rh39, AAV-rh43 или Anc80 AAV, или получен из них.

[0831] Вариант осуществления 53. Композиция по варианту осуществления 52, в которой капсид частицы AAV представляет собой капсид Anc80 AAV.

[0832] Вариант осуществления 54. Композиция по варианту осуществления 53, в которой капсид Anc80 AAV представляет собой капсид Anc80L65 AAV.

[0833] Вариант осуществления 55. Композиция по любому из вариантов осуществления 50-54, причем композиция представляет собой фармацевтическую композицию.

[0834] Вариант осуществления 56. Композиция по варианту осуществления 55, дополнительно содержащая фармацевтически приемлемый носитель.

[0835] Вариант осуществления 57. Композиция по варианту осуществления 55 или 56, которая составлена в дозе от около 1×10^{11} вг/мл до около 1×10^{15} вг/мл.

[0836] Вариант осуществления 58. Композиция по любому из вариантов осуществления 55-57, которая составлена в дозе от около 1×10^{10} до около 1×10^{13} вг/улитку.

[0837] Вариант осуществления 59. Композиция по любому из вариантов осуществления 55-58, которую вводят в объеме от около 0,01 мл до 0,1 мл.

[0838] Вариант осуществления 60. Клетка, содержащая композицию по любому из

вариантов осуществления 50–59.

[0839] Вариант осуществления 61. Клетка по варианту осуществления 60, причем клетка находится *in vivo*, *ex vivo* или *in vitro*.

[0840] Вариант осуществления 62. Клетка по варианту осуществления 60 или 61, причем клетка представляет собой клетку млекопитающего.

[0841] Вариант осуществления 63. Клетка по варианту осуществления 62, причем клетка млекопитающего является клеткой человека.

[0842] Вариант осуществления 64. Клетка по варианту осуществления 60, причем клетку иммортализируют для получения стабильной клеточной линии.

[0843] Вариант осуществления 65. Клетка по варианту осуществления 63, причем клетка человека находится в ухе субъекта.

[0844] Вариант осуществления 66. Клетка по варианту осуществления 63, причем клетка человека представляет собой клетку внутреннего уха.

[0845] Вариант осуществления 67. Клетка по варианту осуществления 66, причем клетка внутреннего уха представляет собой внутреннюю волосковую клетку, наружную волосковую клетку или и ту, и другую.

[0846] Вариант осуществления 68. Система, содержащая композицию по любому из вариантов осуществления 50–59.

[0847] Вариант осуществления 69. Способ, включающий приведение в контакт клетки внутреннего уха с конструкцией по любому из вариантов осуществления 1–46.

[0848] Вариант осуществления 70. Способ, включающий приведение в контакт клетки внутреннего уха с частицей AAV по любому из вариантов осуществления 47–49.

[0849] Вариант осуществления 71. Способ, включающий приведение в контакт клетки внутреннего уха с композицией по любому из вариантов осуществления 50–59.

[0850] Вариант осуществления 72. Способ по любому из вариантов осуществления 69–71, в котором клетка внутреннего уха является наружной волосковой клеткой.

[0851] Вариант осуществления 73. Способ по любому из вариантов осуществления 69–71, в котором клетка внутреннего уха представляет собой внутреннюю волосковую клетку.

[0852] Вариант осуществления 74. Способ по любому из вариантов осуществления 69–73, в котором клетка внутреннего уха находится в ухе субъекта.

- [0853]** Вариант осуществления 75. Способ по любому из вариантов осуществления 69–73, в котором клетка внутреннего уха находится *in vitro* или *ex vivo*.
- [0854]** Вариант осуществления 76. Способ, включающий приведение клетки в контакт с:
- (i) конструкцией по любому из вариантов осуществления 1–46; и
 - (ii) одной или более конструкциями, содержащими ген Rep AAV, ген Cap AAV, ген VA AAV, ген E2a AAV и ген E4 AAV.
- [0855]** Вариант осуществления 77. Способ по варианту осуществления 76, в котором клетка представляет собой клетку внутреннего уха.
- [0856]** Вариант осуществления 78. Способ по варианту осуществления 77, в котором клетка внутреннего уха является наружной волосковой клеткой.
- [0857]** Вариант осуществления 79. Способ по варианту осуществления 77, в котором клетка внутреннего уха представляет собой внутреннюю волосковую клетку.
- [0858]** Вариант осуществления 80. Способ по любому из вариантов осуществления 77–79, в котором клетка внутреннего уха находится *in vitro* или *ex vivo*.
- [0859]** Вариант осуществления 81. Способ, включающий введение конструкции по любому из вариантов осуществления 1–46 во внутреннее ухо субъекта.
- [0860]** Вариант осуществления 82. Способ, включающий введение частицы AAV по любому из вариантов осуществления 47–49 во внутреннее ухо субъекта.
- [0861]** Вариант осуществления 83. Способ, включающий введение композиции по любому из вариантов осуществления 50–59 во внутреннее ухо субъекта.
- [0862]** Вариант осуществления 84. Способ по любому из вариантов осуществления 81–83, в котором конструкцию, частицу AAV или композицию вводят в улитку субъекта.
- [0863]** Вариант осуществления 85. Способ по любому из вариантов осуществления 81–84, в котором конструкцию, частицу AAV или композицию вводят посредством инъекции в мембрану круглого окна.
- [0864]** Вариант осуществления 86. Способ по любому из вариантов осуществления 69–75 и 81–85 дополнительно включающий измерение уровня слуха субъекта.
- [0865]** Вариант осуществления 87. Способ по варианту осуществления 86, в котором уровень слуха измеряют путем выполнения тестирования акустических стволовых

вызванных потенциалов (ABR).

[0866] Вариант осуществления 88. Способ по варианту осуществления 86 или 87, дополнительно включающий сравнение уровня слуха субъекта с эталонным уровнем слуха.

[0867] Вариант осуществления 89. Способ по варианту осуществления 88, в котором эталонный уровень слуха представляет собой опубликованный или исторический эталонный уровень слуха.

[0868] Вариант осуществления 90. Способ по варианту осуществления 89, в котором уровень слуха субъекта измеряют после введения конструкции по любому из вариантов осуществления 1–46, частицы AAV по любому из вариантов осуществления 47–49 или композиции по любому из вариантов осуществления 50–59, а эталонный уровень слуха представляет собой уровень слуха субъекта, который был измерен до введения конструкции по любому из вариантов осуществления 1–46, частицы AAV по любому из вариантов осуществления 47–49 или композиции по любому из вариантов осуществления 50–59.

[0869] Вариант осуществления 91. Способ по любому из вариантов осуществления 69–75 и 81–90, дополнительно включающий измерение уровня агента, связывающего фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), или его части у субъекта.

[0870] Вариант осуществления 92. Способ по варианту осуществления 91, в котором уровень агента, связывающего фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), или его части измеряют во внутреннем ухе субъекта.

[0871] Вариант осуществления 93. Способ по варианту осуществления 91 или 92, в котором уровень агента, связывающего фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), или его части измеряют в улитке субъекта.

[0872] Вариант осуществления 94. Способ по любому из вариантов осуществления 69–75 и 81–93, дополнительно включающий сравнение уровня агента, связывающего фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), или его части у субъекта с эталонным уровнем агента, связывающего фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), или его части.

[0873] Вариант осуществления 95. Способ по варианту осуществления 94, в котором эталонный уровень агента, связывающего фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), или его части представляет собой опубликованный или исторический эталонный уровень агента, связывающего фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) или его часть.

[0874] Вариант осуществления 96. Способ по любому из вариантов осуществления 91–95, в котором уровень агента, связывающего фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), или

его части у субъекта измеряют после введения конструкции по любому из вариантов осуществления 1–46, частицы AAV по любому из вариантов осуществления 47–49 или композиции по любому из вариантов осуществления 50–59, а эталонный уровень агента, связывающего фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), или его части представляет собой уровень агента, связывающего фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), или его части у субъекта, который был измерен перед введением конструкции по любому из вариантов осуществления 1–46, частицы AAV по любому из вариантов осуществления 47–49 или композиции по любому из вариантов осуществления 50–59.

[0875] Вариант осуществления 97. Способ по любому из вариантов осуществления 69–75 и 81–96 дополнительно включающий измерение объема опухоли у субъекта.

[0876] Вариант осуществления 98. Способ по варианту осуществления 97, дополнительно включающий сравнение объема опухоли у субъекта с эталонным объемом опухоли.

[0877] Вариант осуществления 99. Способ по варианту осуществления 98, в котором эталонный объем опухоли представляет собой опубликованный или исторический эталонный объем опухоли.

[0878] Вариант осуществления 100. Способ по варианту осуществления 97–99, в котором объем опухоли у субъекта измеряют после введения конструкции по любому из вариантов осуществления 1–46, частицы AAV по любому из вариантов осуществления 47–49 или композиции по любому из вариантов осуществления 50–59, а эталонный уровень объема опухоли представляет собой объем опухоли у субъекта, который был измерен до введения конструкции по любому из вариантов осуществления 1–46, частицы AAV по любому из вариантов осуществления 47–49 или композиции по любому из вариантов осуществления 50–59.

[0879] Вариант осуществления 101. Способ лечения потери слуха или лечения заболевания внутреннего уха, включающий введение конструкции по любому из вариантов осуществления 1–46, частицы AAV по любому из вариантов осуществления 47–49 или композиции по любому из вариантов осуществления 50–59 нуждающемуся в этом субъекту.

[0880] Вариант осуществления 102. Способ по любому из вариантов осуществления 74 и 81–101, в котором субъект страдает отологическим заболеванием, характеризующимся неоваскуляризацией, или находится в группе риска его развития.

[0881] Вариант осуществления 103. Способ по варианту осуществления 102, в котором

отологическое заболевание представляет собой или включает акустическую неврому.

[0882] Вариант осуществления 104. Способ по варианту осуществления 102, в котором отологическое заболевание представляет собой или включает вестибулярную шванному.

[0883] Вариант осуществления 105. Способ по варианту осуществления 104, в котором субъект с вестибулярной шванномой имеет нейрофиброматоз 2-го типа (NF2).

[0884] Вариант осуществления 106. Способ по любому из вариантов осуществления 102–105, в котором один или более симптомов, ассоциированных с отологическим заболеванием, облегчаются или ослабевают.

[0885] Вариант осуществления 107. Способ по варианту осуществления 106, в котором один или более симптомов включают потерю слуха, дегенерацию волосковых клеток, изменение биохимического состава жидкостей внутреннего уха, повышенный уровень внутрилабиринтного белка, эндолимфатический гидропс, обструкцию улиткового отверстия, внутрилабиринтное кровоизлияние, нарушение кровоснабжения улитки, шум в ушах, головокружение, некупируемую головную боль, невропатию лицевого нерва, невропатию тройничного нерва, паралич лицевого нерва, парестезию лицевого нерва, гидроцефалию, грыжу мозжечка, летальный исход или их комбинацию.

[0886] Вариант осуществления 108. Способ по любому из вариантов осуществления 69–75, 81–102 и 104–107, причем способ представляет собой способ лечения вестибулярной шванномы.

[0887] Вариант осуществления 109. Способ по любому из вариантов осуществления 69–75 и 81–107, причем способ представляет собой способ модуляции уровня VEGF.

[0888] Вариант осуществления 110. Способ по любому из вариантов осуществления 69–75 и 81–107, причем способ представляет собой способ модуляции уровня активного VEGF.

[0889] Вариант осуществления 111. Способ по любому из вариантов осуществления 69–75 и 81–107, причем способ представляет собой способ снижения активности VEGF.

[0890] Вариант осуществления 112. Конструкция по любому из вариантах осуществления 1–46 для применения при лечении отологического заболевания, характеризующегося неоваскуляризацией и/или одним или более симптомами, ассоциированными с отологическим заболеванием.

[0891] Вариант осуществления 113. Частица AAV по любому из вариантов осуществления 47–49 для применения при лечении отологического заболевания,

характеризующегося неоваскуляризацией и/или одним или более симптомами, ассоциированными с отологическим заболеванием.

[0892] Вариант осуществления 114. Композиция по любому из вариантов осуществления 50–59 для применения при лечении отологического заболевания, характеризующегося неоваскуляризацией и/или одним или более симптомами, ассоциированными с отологическим заболеванием.

[0893] Вариант осуществления 115. Конструкция по варианту осуществления 112, частица AAV по варианту осуществления 113 или композиция по варианту осуществления 114, причем один или более симптомов, ассоциированных с отологическим заболеванием, включают потерю слуха, дегенерацию волосковых клеток, изменение биохимического состава жидкостей внутреннего уха, повышенный уровень внутрилабиринтного белка, эндолимфатический гидропс, обструкцию улиткового отверстия, внутрилабиринтное кровоизлияние, нарушение кровоснабжения улитки, шум в ушах, головокружение, некупируемую головную боль, невралгию лицевого нерва, невралгию тройничного нерва, паралич лицевого нерва, парестезию лицевого нерва, гидроцефалию, грыжу мозжечка, летальный исход или их комбинацию.

[0894] Вариант осуществления 116. Применение конструкции по любому из вариантах осуществления 1–46 для производства лекарственного средства для лечения отологического заболевания, характеризующегося неоваскуляризацией и/или одним или более симптомами, ассоциированными с отологическим заболеванием.

[0895] Вариант осуществления 117. Применение частицы по любому из вариантов осуществления 47–49 для производства лекарственного средства для лечения отологического заболевания, характеризующегося неоваскуляризацией и/или одним или более симптомами, ассоциированными с отологическим заболеванием.

[0896] Вариант осуществления 118. Применение композиции по любому из вариантов осуществления 50–59 для производства лекарственного средства для лечения отологического заболевания, характеризующегося неоваскуляризацией и/или одним или более симптомами, ассоциированными с отологическим заболеванием.

[0897] Вариант осуществления 119. Применение по любому из вариантов осуществления 116–118, причем один или более симптомов, ассоциированных с отологическим заболеванием, включают потерю слуха, дегенерацию волосковых клеток, изменение биохимического состава жидкостей внутреннего уха, повышенный уровень внутрилабиринтного белка, эндолимфатический гидропс, обструкцию улиткового

отверстия, внутрилабиринтное кровоизлияние, нарушение кровоснабжения улитки, шум в ушах, головокружение, некупируемую головную боль, невралгию лицевого нерва, невралгию тройничного нерва, паралич лицевого нерва, парестезию лицевого нерва, гидроцефалию, грыжу мозжечка, летальный исход или их комбинацию.

[0898] Вариант осуществления 120. Популяция клеток, включающая одну или более клеток по любому из вариантов осуществления 60–67, причем популяция представляет собой или включает стабильную линию клеток.

[0899] Вариант осуществления 121. Набор, содержащий композицию по любому из вариантов осуществления 50–59.

[0900] Вариант осуществления 122. Набор по варианту осуществления 121, в котором композиция предварительно загружена в устройство.

[0901] Вариант осуществления 123. Набор по варианту осуществления 122, в котором устройство представляет собой микрокатетер.

[0902] Вариант осуществления 124. Набор по варианту осуществления 123, в котором микрокатетер имеет такую форму, что он может входить в полость среднего уха через наружный слуховой проход и обеспечить контакт конца микрокатетера с RWM.

[0903] Вариант осуществления 125. Набор по варианту осуществления 123 или 124, в котором дистальный конец микрокатетера состоит из по меньшей мере одной микроиглы диаметром от 10 до 1000 микрон.

[0904] Вариант осуществления 126. Набор по любому из вариантов осуществления 121–125, дополнительно содержащий устройство.

[0905] Вариант осуществления 127. Набор по варианту осуществления 126, в котором устройство представляет собой устройство, представленное на любой из фиг. 29–32.

[0906] Вариант осуществления 128. Набор по любому из вариантов осуществления 122–127, в котором устройство содержит иглу, имеющую изогнутую часть и скошенный под углом кончик.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Конструкция, содержащая кодирующую последовательность, функционально связанную с промотором, причем кодирующая последовательность кодирует агент, связывающий фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) или его часть.
2. Конструкция по п. 1, в которой промотор представляет собой промотор CAG, промотор CBA, промотор CMV или промотор CB7.
3. Конструкция по п. 1 или п. 2, в которой VEGF-связывающий агент представляет собой или включает антитело или его фрагмент.
4. Конструкция по п. 3, в которой фрагмент антитела представляет собой фрагмент Fab, фрагмент Fab', фрагмент F(ab')₂, фрагмент Fd, фрагмент Fd', определяющую комплементарность область (CDR), одноцепочечный Fv или домен Fc.
5. Конструкция по любому из пп. 1–4, в которой VEGF-связывающий агент представляет собой или включает тяжелую цепь иммуноглобулина, легкую цепь иммуноглобулина или их комбинацию.
6. Конструкция по любому из пп. 1–5, в которой VEGF-связывающий агент содержит:
 - (i) полипептид, содержащий аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 16,
 - (ii) полипептид, содержащий аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 20, или
 - (iii) их комбинацию.
7. Конструкция по п. 6, в которой VEGF-связывающий агент представляет собой или включает ранибизумаб.
8. Конструкция по любому из пп. 1–3 или пп. 5–6, в которой кодирующая последовательность включает:
 - (i) последовательность нуклеиновой кислоты, включающую SEQ ID NO: 13,

- (ii) последовательность нуклеиновой кислоты, включающую SEQ ID NO: 19, или
- (iii) их комбинацию.

9. Конструкция по любому из пп. 1–8, в которой кодирующая последовательность включает одну или более последовательностей нуклеиновых кислот, каждая из которых кодирует сигнальный пептид.

10. Конструкция по п. 9, в которой по меньшей мере одна последовательность нуклеиновой кислоты кодирует сигнальный пептид интерлейкина 2 (IL2).

11. Конструкция по любому из пп. 1–10, в которой кодирующая последовательность содержит одну или более последовательностей, кодирующих саморасщепляющийся пептид.

12. Конструкция по п. 11, в которой саморасщепляющийся пептид представляет собой пептид 2A вируса *Thosea asigna* (T2A).

13. Конструкция по любому из пп. 1–3 или пп. 5–12, в которой кодирующая последовательность представляет собой или включает последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 21.

14. Конструкция по любому из пп. 1–13, дополнительно содержащая два инвертированных концевых повтора (ITR) AAV, причем два ITR AAV фланкируют кодирующую последовательность и промотор.

15. Конструкция по п. 14, в которой два ITR AAV являются ITR AAV2 или получены из них.

16. Конструкция по п. 14 или п. 15, в которой два ITR AAV содержат 5'-ITR, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 45 или 47, и 3'-ITR, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 46 или 48.

17. Конструкция по п. 1, причем конструкция содержит последовательность

нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 90, 91, 92 или 106.

18. Частица AAV, содержащая конструкцию по любому из пп. 1–17.
19. Частица AAV по п. 18, дополнительно содержащая капсид AAV, причем капсид AAV представляет собой капсид AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV-rh8, AAV-rh10, AAV-rh39, AAV-rh43 или Anc80 AAV, или получен из них.
20. Частица AAV по п. 19, в которой капсид AAV представляет собой капсид Anc80 AAV, необязательно капсид Anc80L65 AAV.
21. Частица AAV по п. 19 или п. 20, в которой капсид AAV содержит полипептид в соответствии с SEQ ID NO: 113 или SEQ ID NO: 114.
22. Композиция, содержащая конструкцию по любому из пп. 1–17 или частицу AAV по любому из пп. 18–21.
23. Фармацевтическая композиция по п. 22, причем композиция представляет собой композицию, дополнительно содержащую фармацевтически приемлемый носитель.
24. Композиция по п. 22 или п. 23, которая составлена в дозе от около 1×10^{11} вг/мл до около 1×10^{15} вг/мл.
25. Композиция по любому из пп. 22–24, которая составлена в дозе от около 1×10^{10} до около 1×10^{13} вг/улитку.
26. Композиция по любому из пп. 22–25, которую вводят в объеме от около 0,01 мл до 0,1 мл.
27. Способ, включающий приведение в контакт клетки внутреннего уха с конструкцией по любому из пп. 1–17, частицей AAV по любому из пп. 18–21 или композицией по любому из пп. 22–26.
28. Способ, включающий приведение клетки в контакт с:

(i) конструкцией по любому из пп. 1–17; и
(ii) одной или более конструкциями, содержащими ген Rep AAV, ген Cap AAV, ген VA AAV, ген E2a AAV и ген E4 AAV.

29. Способ, включающий введение конструкции по любому из пп. 1–17, частицы AAV по любому из пп. 18–21 или композицией по любому из пп. 22–26 во внутреннее ухо субъекта.

30. Способ по п. 29, дополнительно включающий измерение уровня слуха субъекта.

31. Способ по п. 30, дополнительно включающий сравнение уровня слуха субъекта с эталонным уровнем слуха.

32. Способ по п. 31, в котором уровень слуха субъекта измеряют после введения конструкции по любому из пп. 1–17, частицы AAV по любому из пп. 18–21 или композиции по любому из пп. 22–26, а эталонный уровень слуха представляет собой уровень слуха субъекта, который был измерен до введения конструкции по любому из пп. 1–17, частицы AAV по любому из пп. 18–21 или композиции по любому из пп. 22–26.

33. Способ по любому из пп. 29–32, дополнительно включающий измерение уровня агента, связывающего фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), или его части у субъекта.

34. Способ по п. 33, дополнительно включающий сравнение уровня агента, связывающего фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), или его части у субъекта с эталонным уровнем агента, связывающего фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), или его части.

35. Способ по любому из пп. 29–34, дополнительно включающий измерение объема опухоли у субъекта.

36. Способ по п. 35, дополнительно включающий сравнение объема опухоли у субъекта с эталонным объемом опухоли.

37. Способ лечения потери слуха, включающий введение конструкции по любому из пп.

1–17, частицы AAV по любому из пп. 18–21 или композиции по любому из пп. 22–26 нуждающемуся в этом субъекту.

38. Способ лечения заболевания внутреннего уха, включающий введение конструкции по любому из пп. 1–17, частицы AAV по любому из пп. 18–21 или композиции по любому из пп. 22–26 нуждающемуся в этом субъекту.

39. Способ по п. 38, в котором заболевание внутреннего уха представляет собой акустическую неврому, вестибулярную шванному или нейрофиброматоз II типа.

40. Способ лечения вестибулярной шванномы у млекопитающего, включающий введение конструкции по любому из пп. 1–17, частицы AAV по любому из пп. 18–21 или композиции по любому из пп. 22–26 нуждающемуся в этом субъекту.

41. Конструкция по любому из пп. 1–17, частица AAV по любому из пп. 18–21 или композиция по любому из пп. 22–26 для применения при лечении отологического заболевания, характеризующегося неоваскуляризацией и/или одним или более симптомами, ассоциированными с отологическим заболеванием.

42. Конструкция по любому из пп. 1–17, частица AAV по любому из пп. 18–21 или композиция по любому из пп. 22–26 для применения при лечении заболевания внутреннего уха.

43. Конструкция для применения по п. 42, причем заболевание внутреннего уха представляет собой акустическую неврому, вестибулярную шванному или нейрофиброматоз II типа.

44. Конструкция по любому из пп. 1–17, частица AAV по любому из пп. 18–21 или композиция по любому из пп. 22–26 для применения при лечении вестибулярной шванномы.

45. Применение конструкции по любому из пп. 1–17, частицы AAV по любому из пп. 18–21 или композиции по любому из пп. 22–26 для производства лекарственного средства

для лечения отологического заболевания, характеризующегося неоваскуляризацией и/или одним или более симптомами, ассоциированными с отологическим заболеванием.

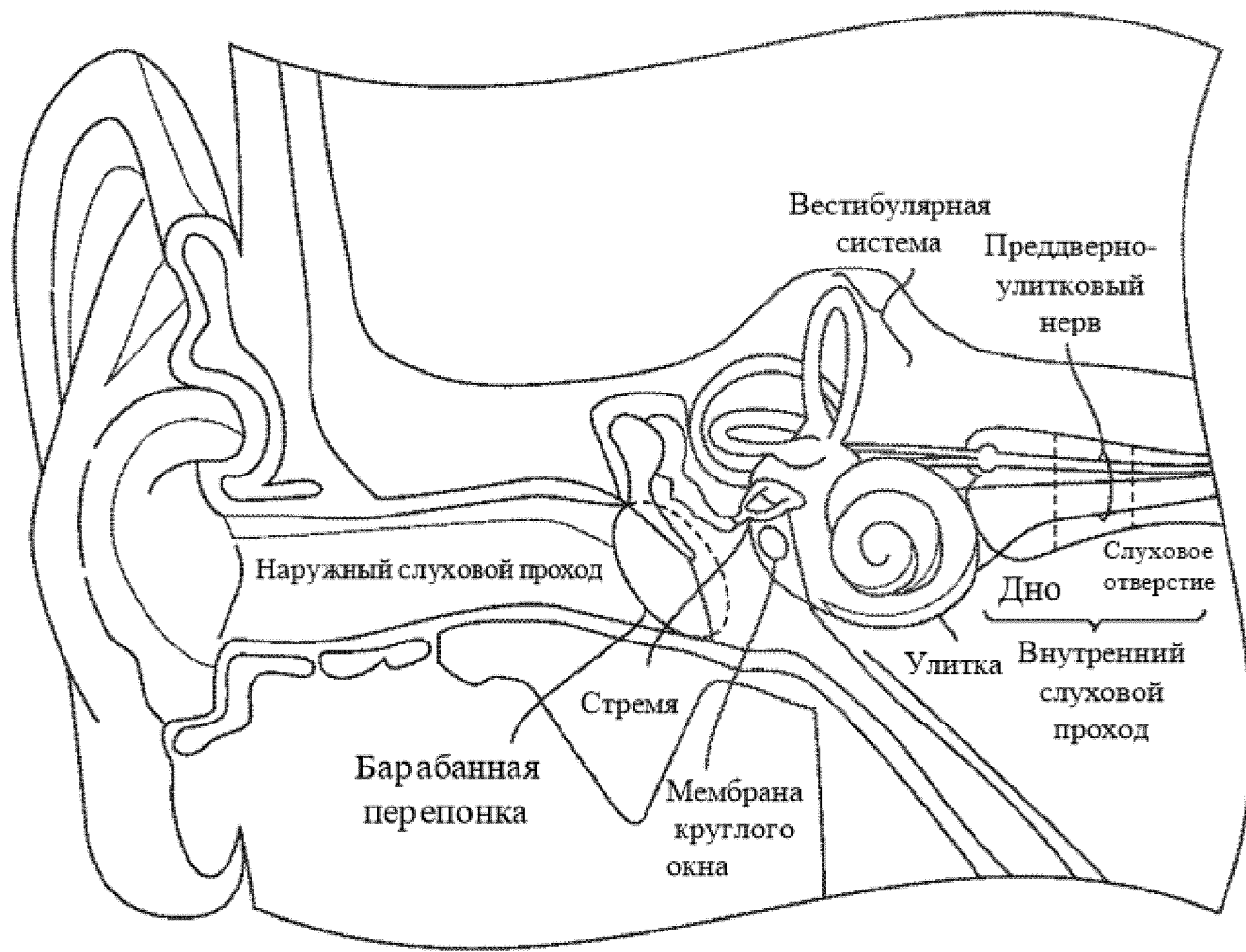
46. Применение конструкции по любому из пп. 1–17, частицы AAV по любому из пп. 18–21 или композиции по любому из пп. 22–26 для производства лекарственного средства для лечения заболевания внутреннего уха.

47. Применение по п. 46, в котором заболевание внутреннего уха представляет собой акустическую неврому, вестибулярную шванному или нейрофиброматоз II типа.

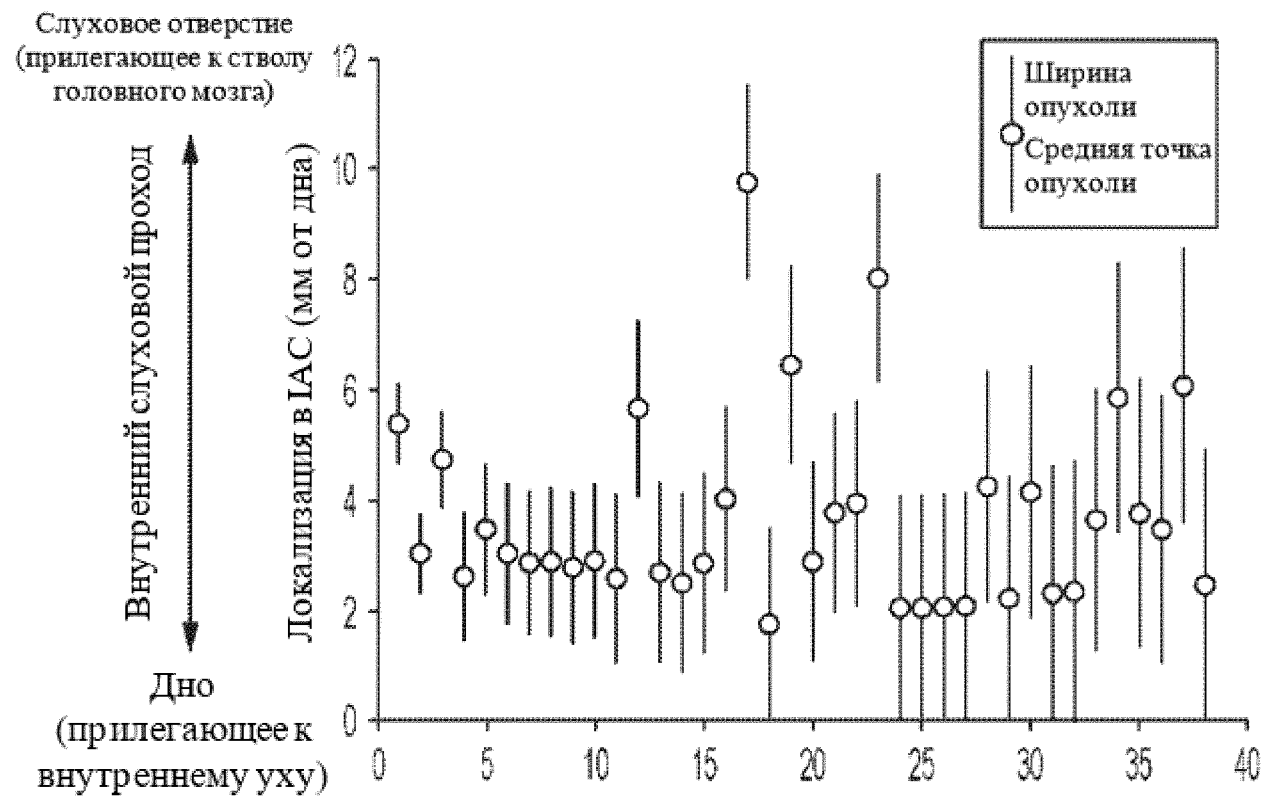
48. Применение конструкции по любому из пп. 1–17, частицы AAV по любому из пп. 18–21 или композиции по любому из пп. 22–26 для производства лекарственного средства для лечения вестибулярной шванномы.

49. Способ по любому из пп. 37–40, конструкция AAV для применения по любому из пп. 41–44 или применение по любому из пп. 45–48, в котором млекопитающее является человеком.

50. Набор, содержащий конструкцию по любому из пп. 1–17, частицу AAV по любому из пп. 18–21 или композицию по любому из пп. 22–26.

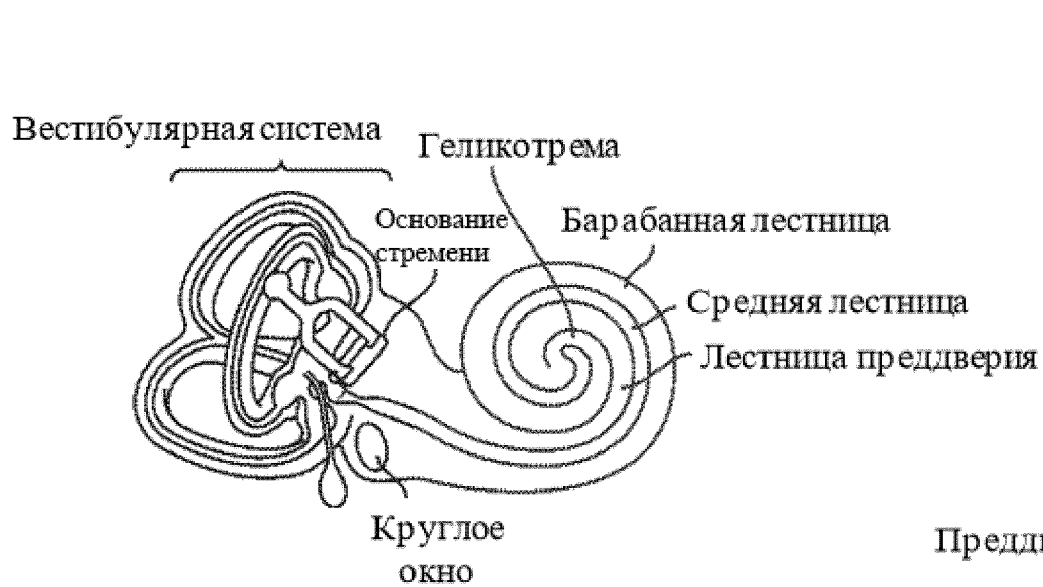


Фиг. 1



Количество опухолей, упорядоченное по ширине опухоли

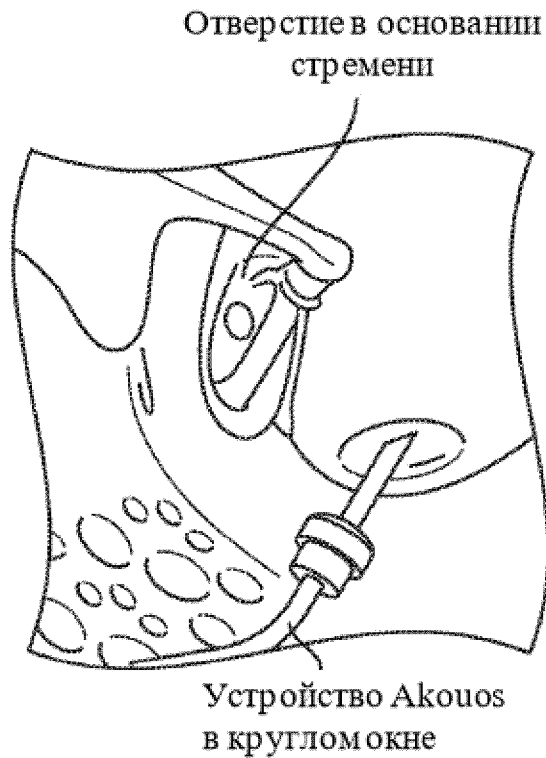
Фиг. 2



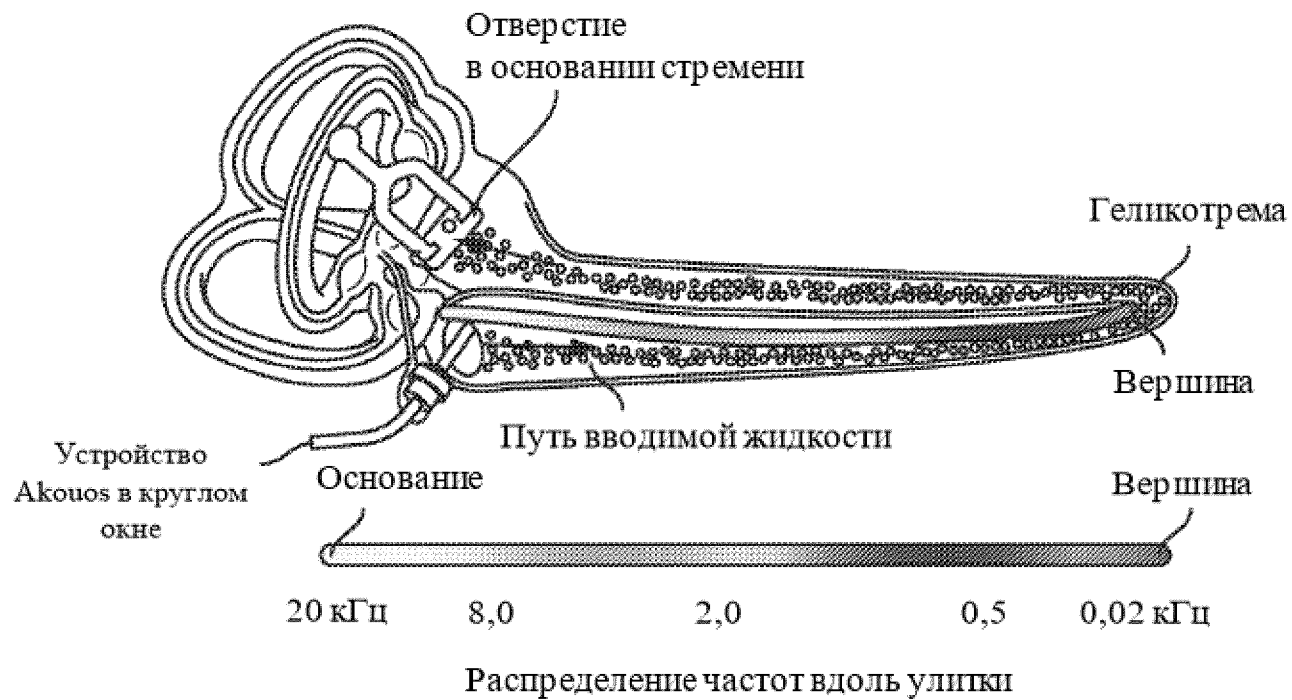
Фиг. 3А



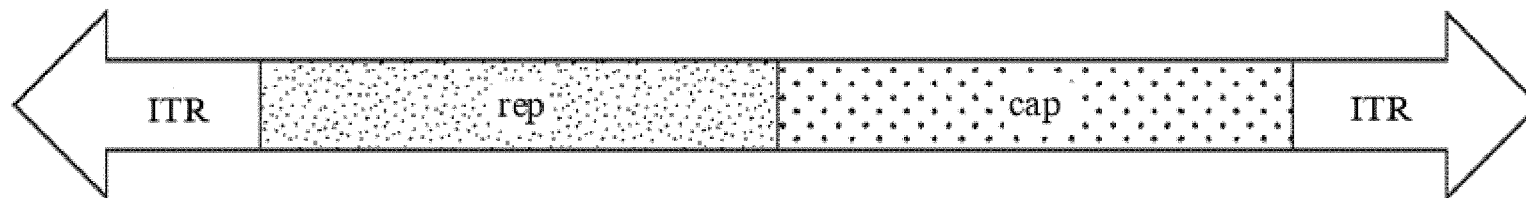
Фиг. 3В



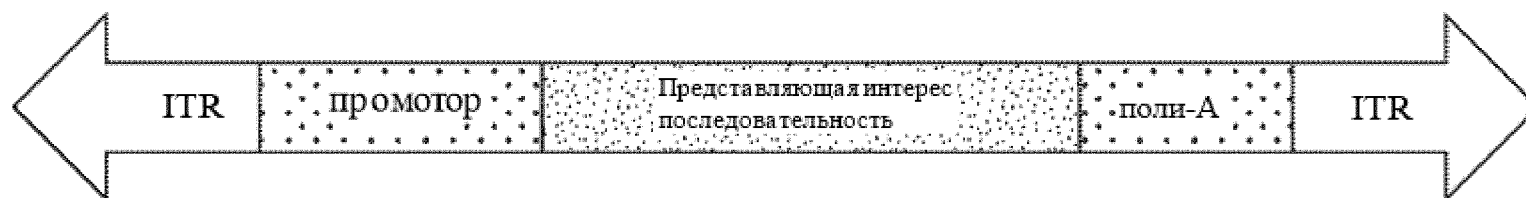
Фиг. 4А



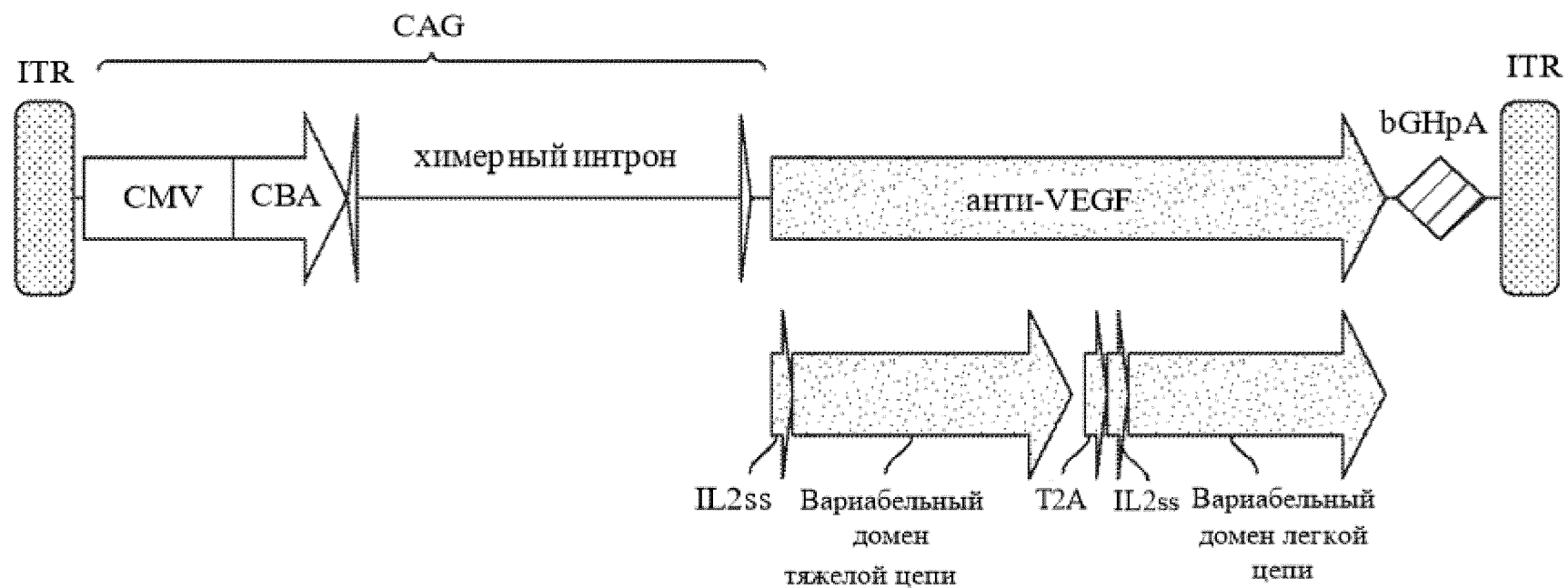
Фиг. 4В



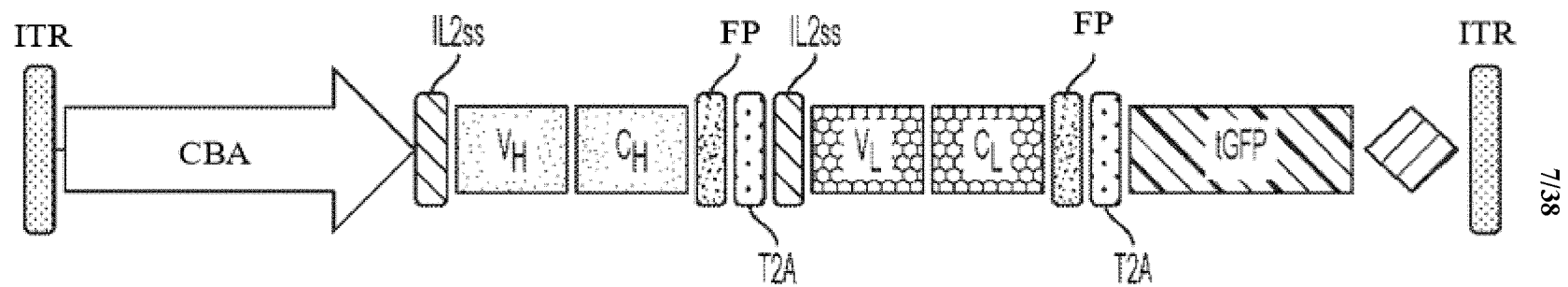
Фиг. 5А



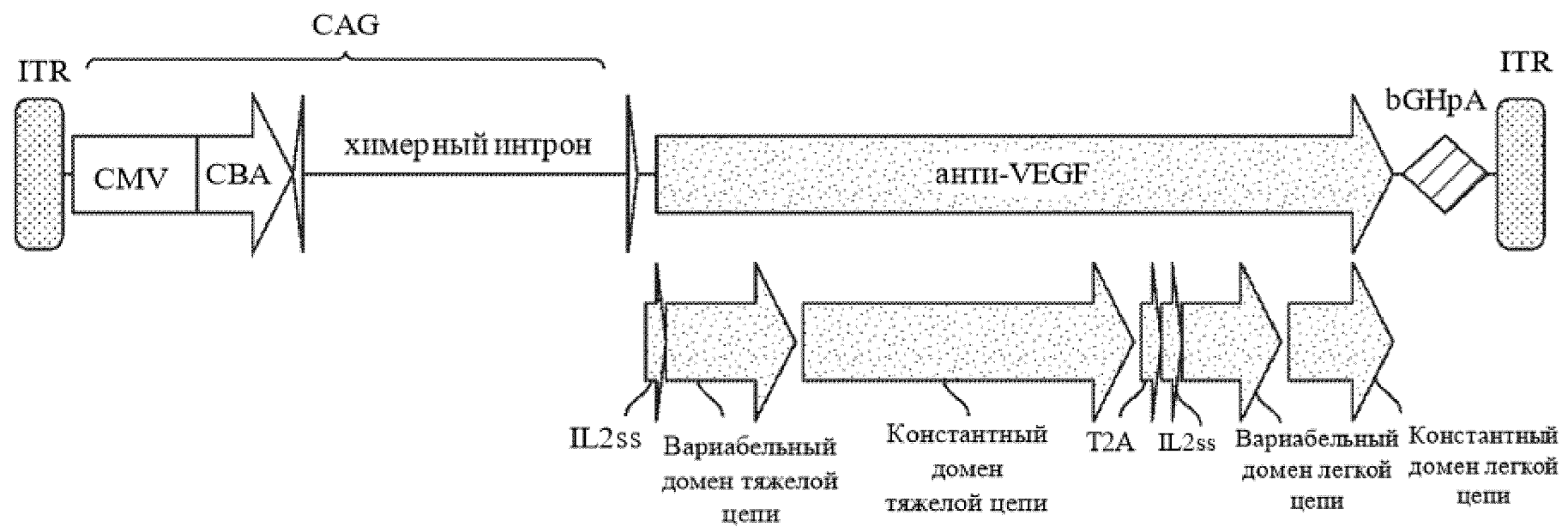
Фиг. 5В



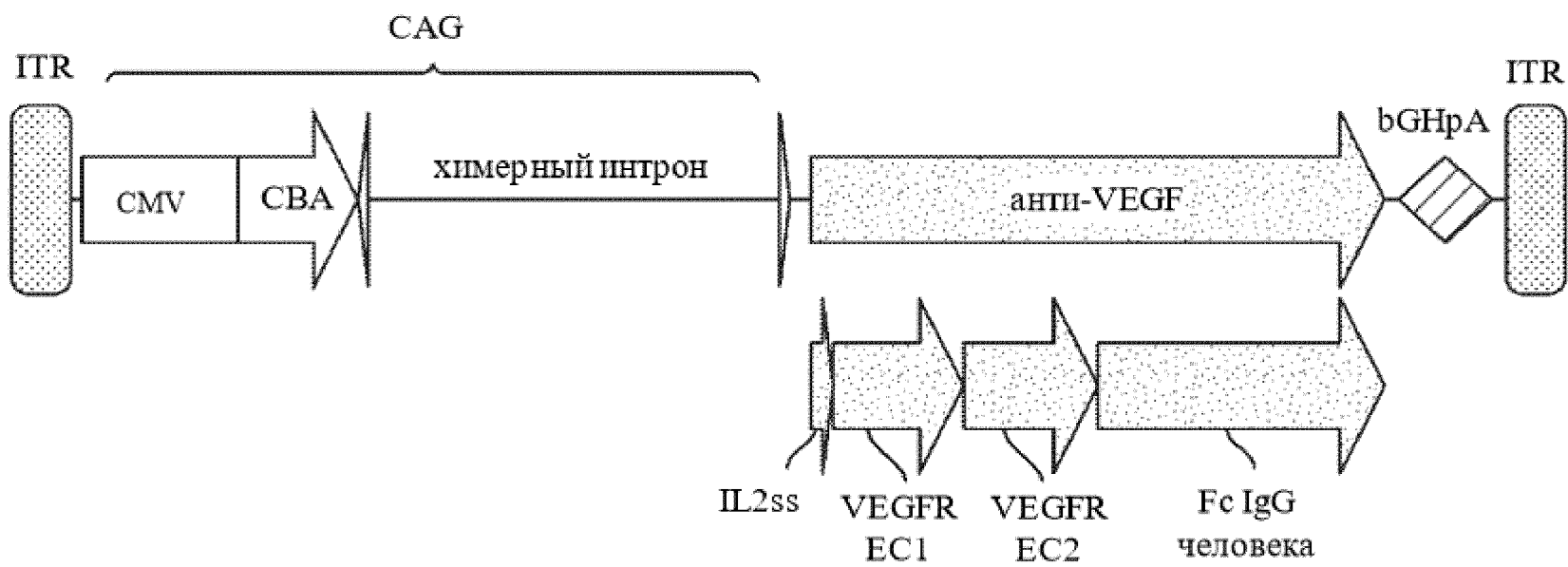
Фиг. 6А



Фиг. 6B

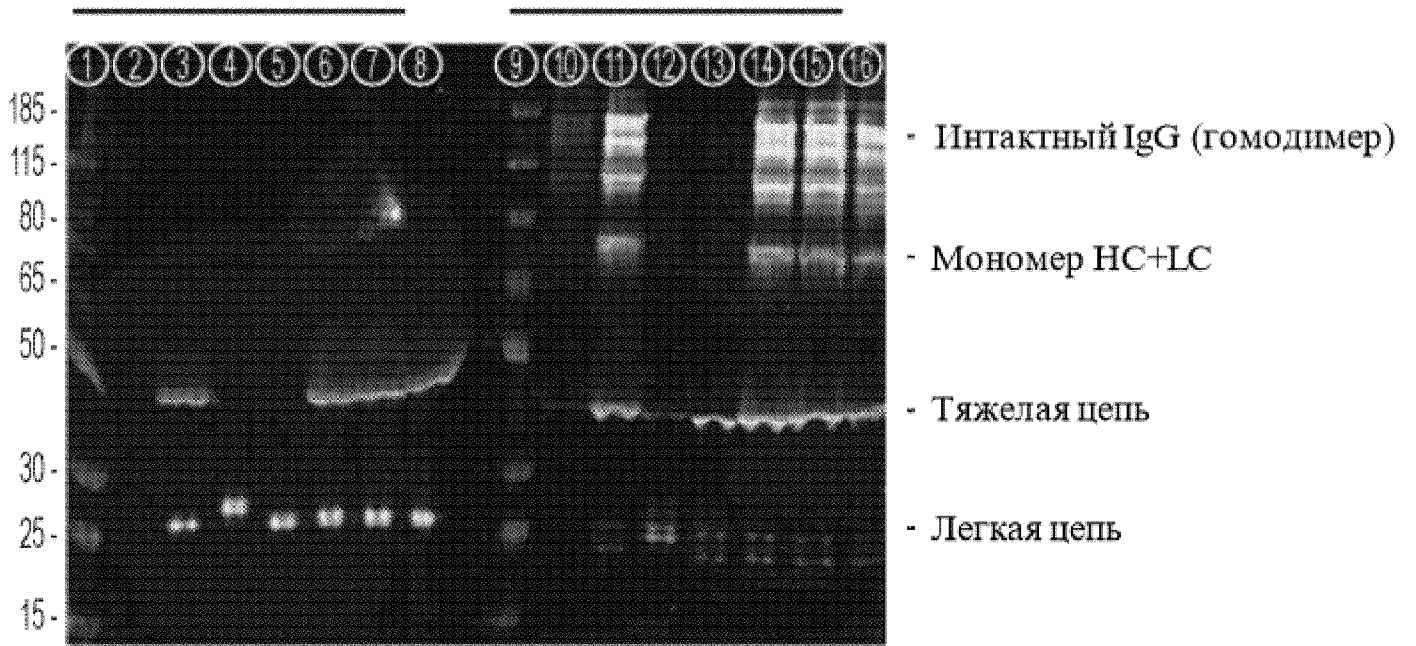


Фиг. 6С



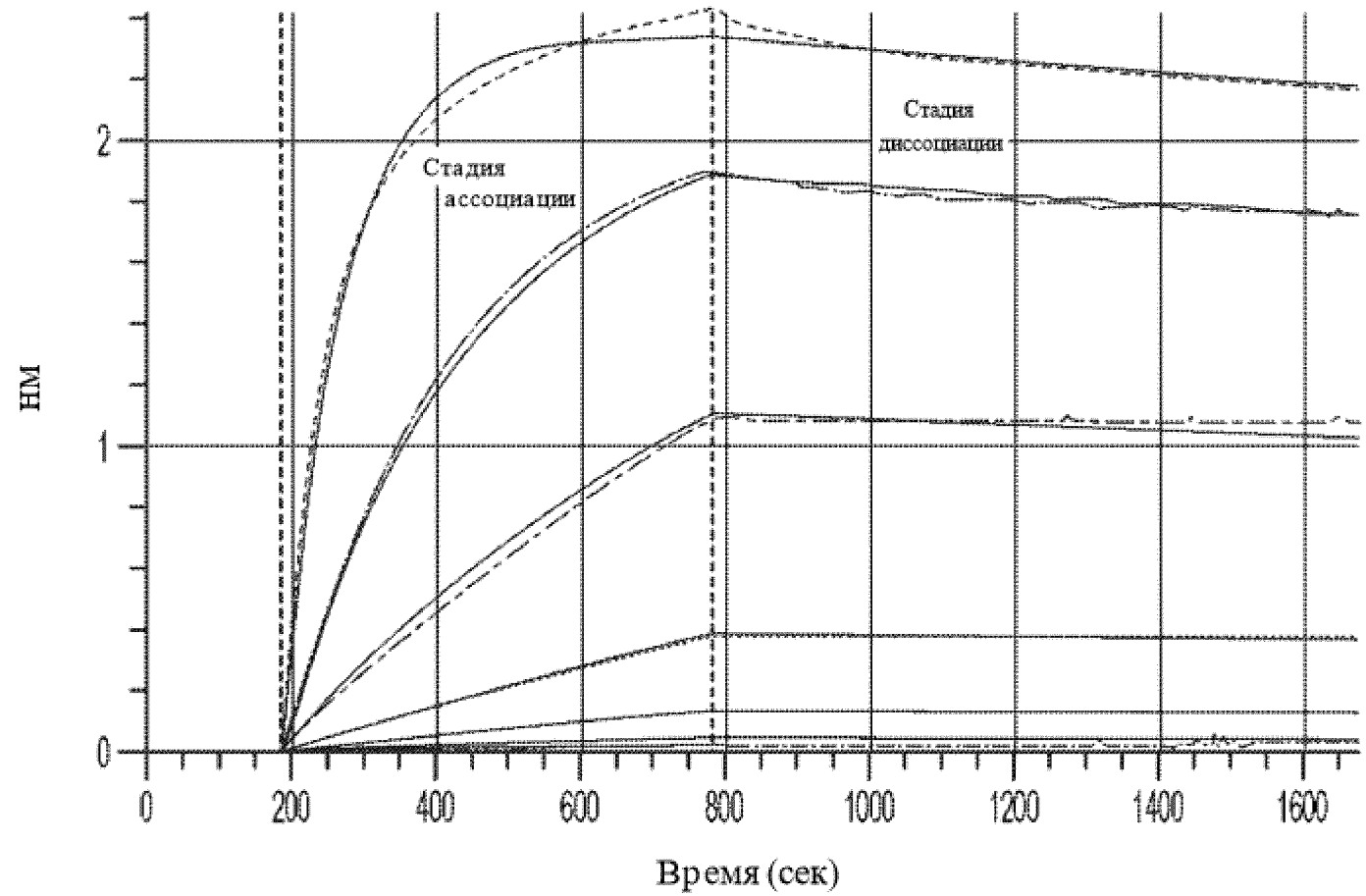
ФИГ. 6D

Восстанавливающие условия Невосстанавливающие условия



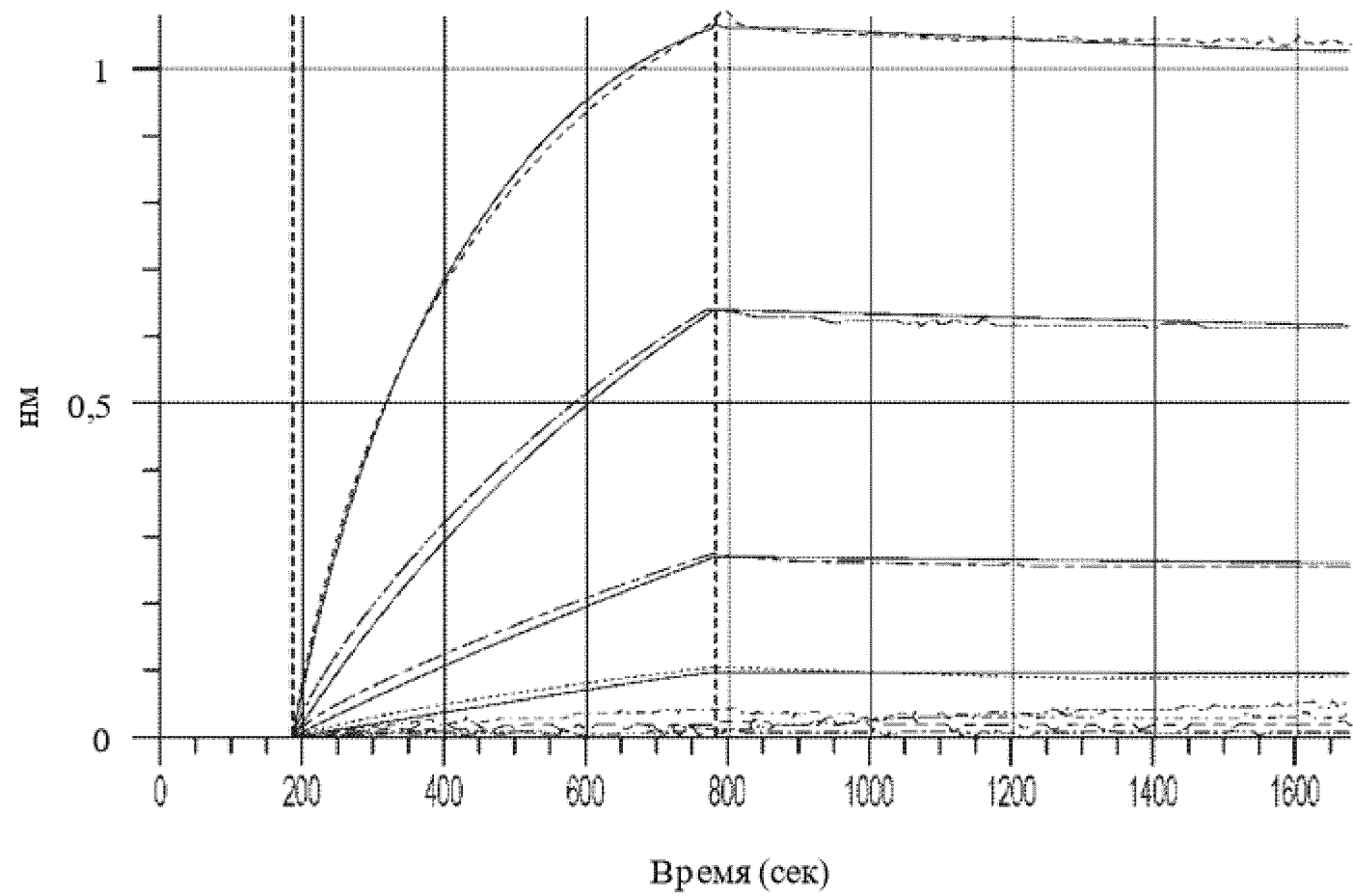
Фиг. 7

АНТИ-VEGF MmAb-R&D



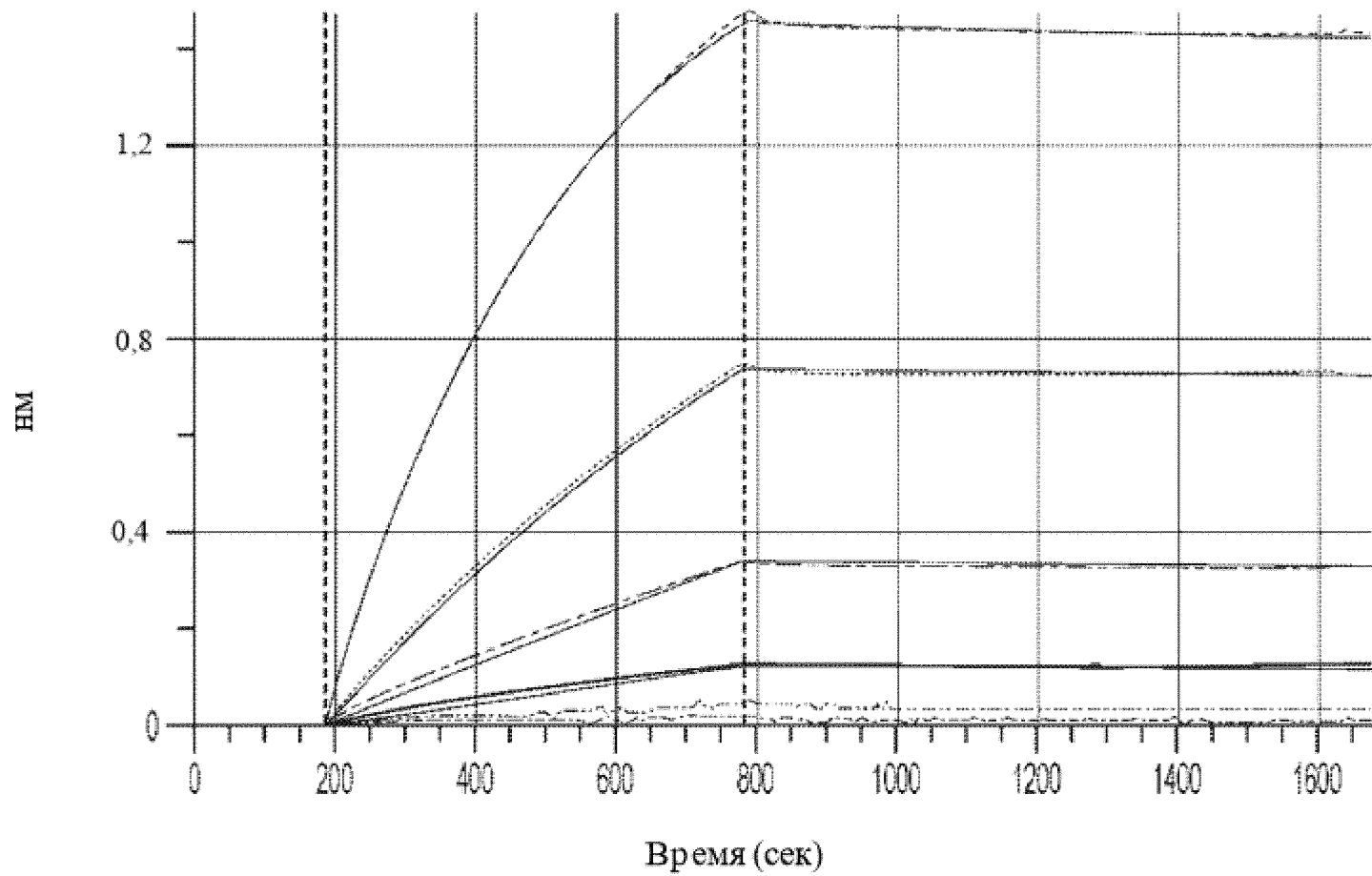
Фиг. 8А

Ранибизумаб



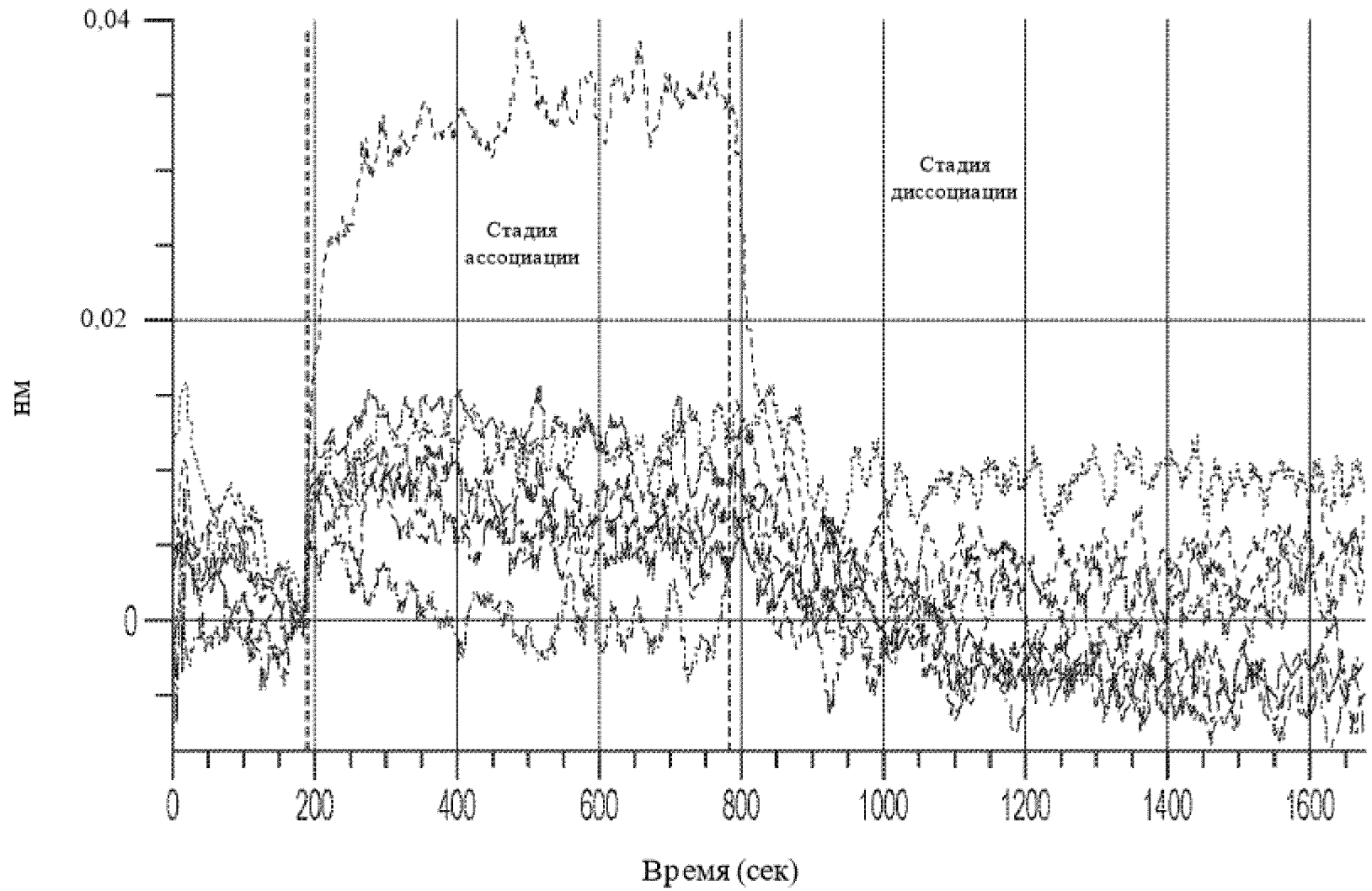
Фиг. 8В

Бевацизумаб

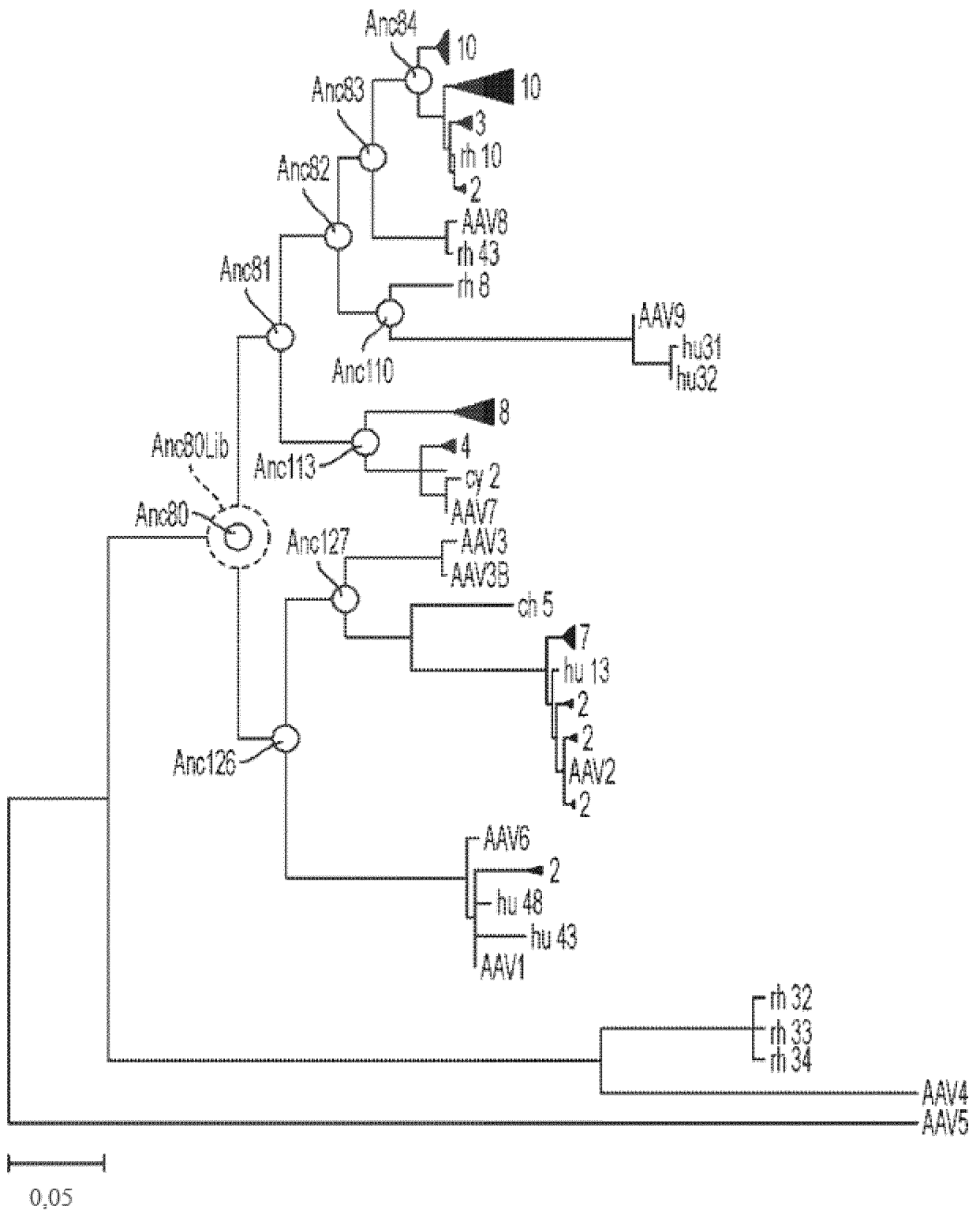


Фиг. 8С

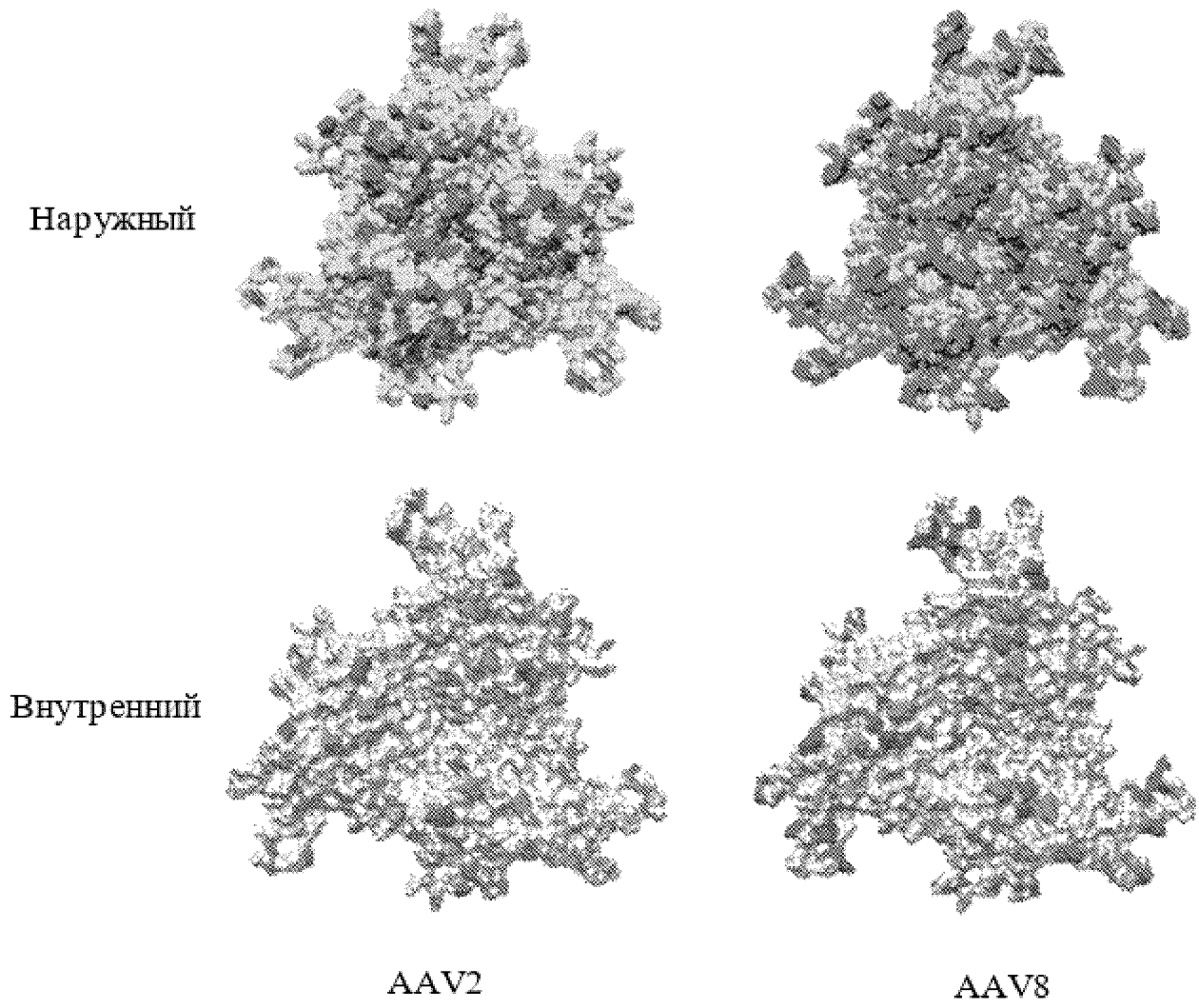
КОНТРОЛЬ КОНДИЦИОНИРОВАННОЙ
СРЕДЫ



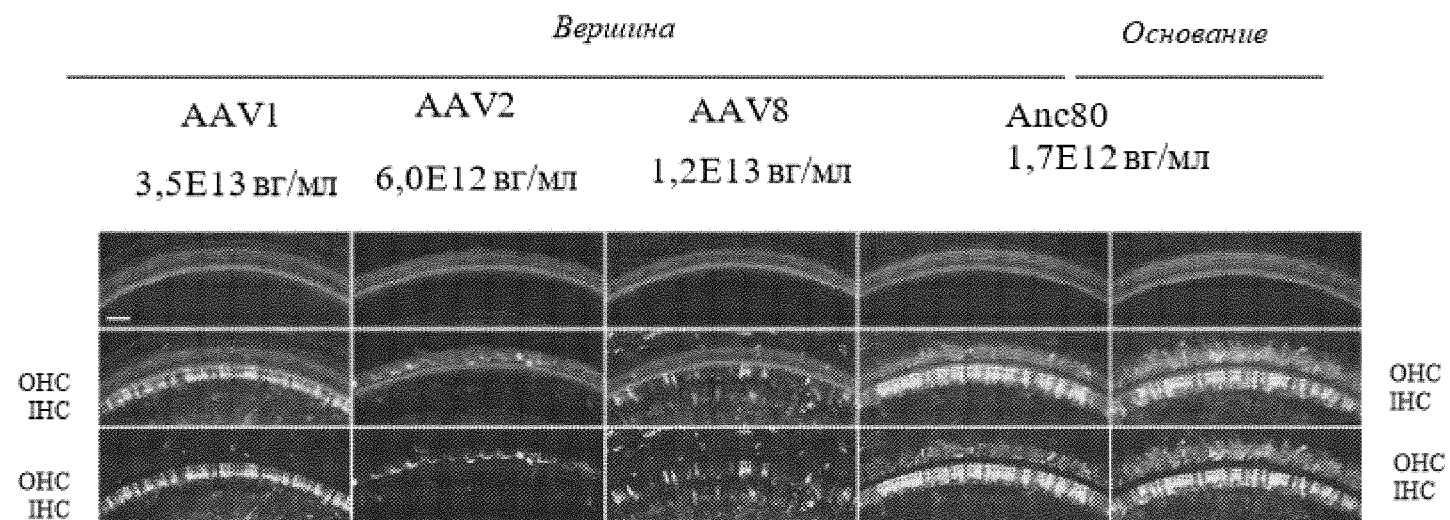
Фиг. 8D



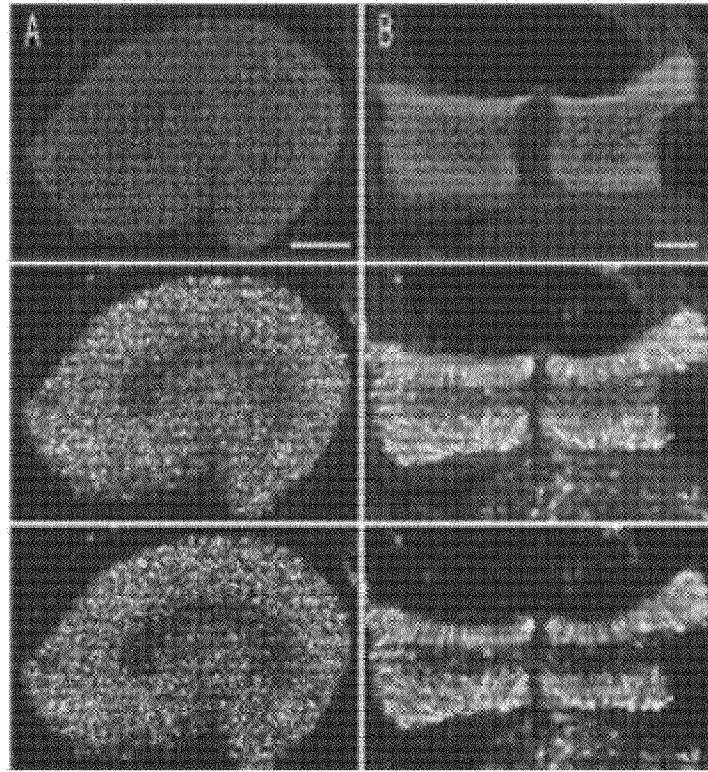
Фиг. 9



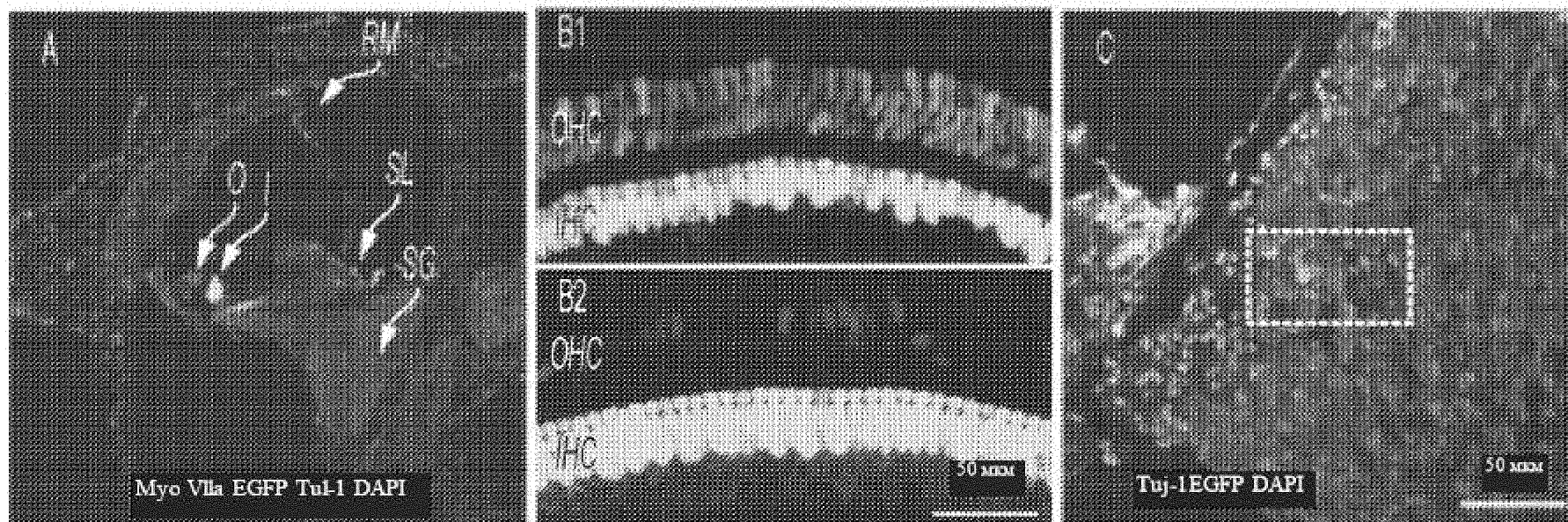
ФИГ.10



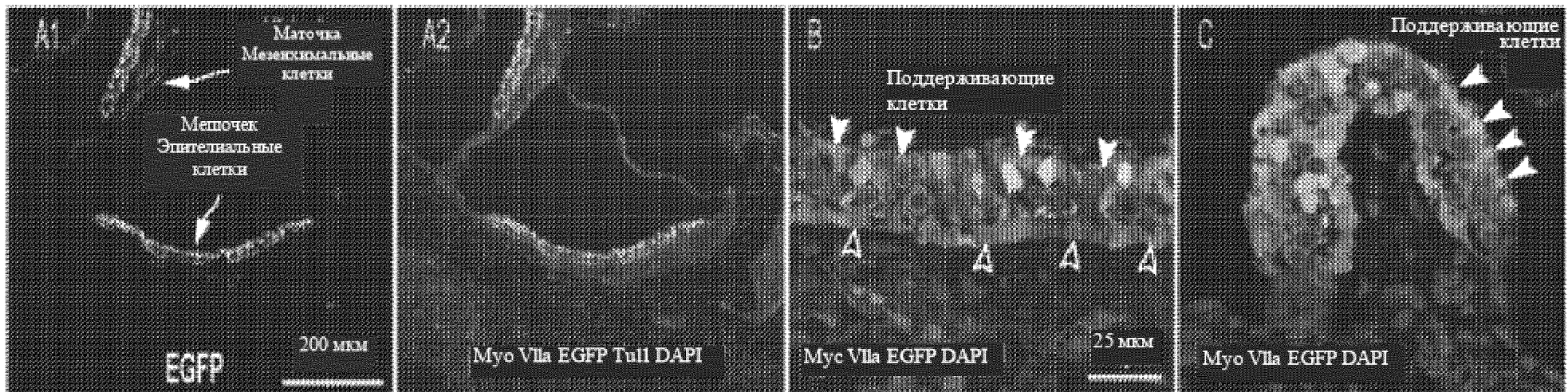
Фиг. 11



Фиг. 12

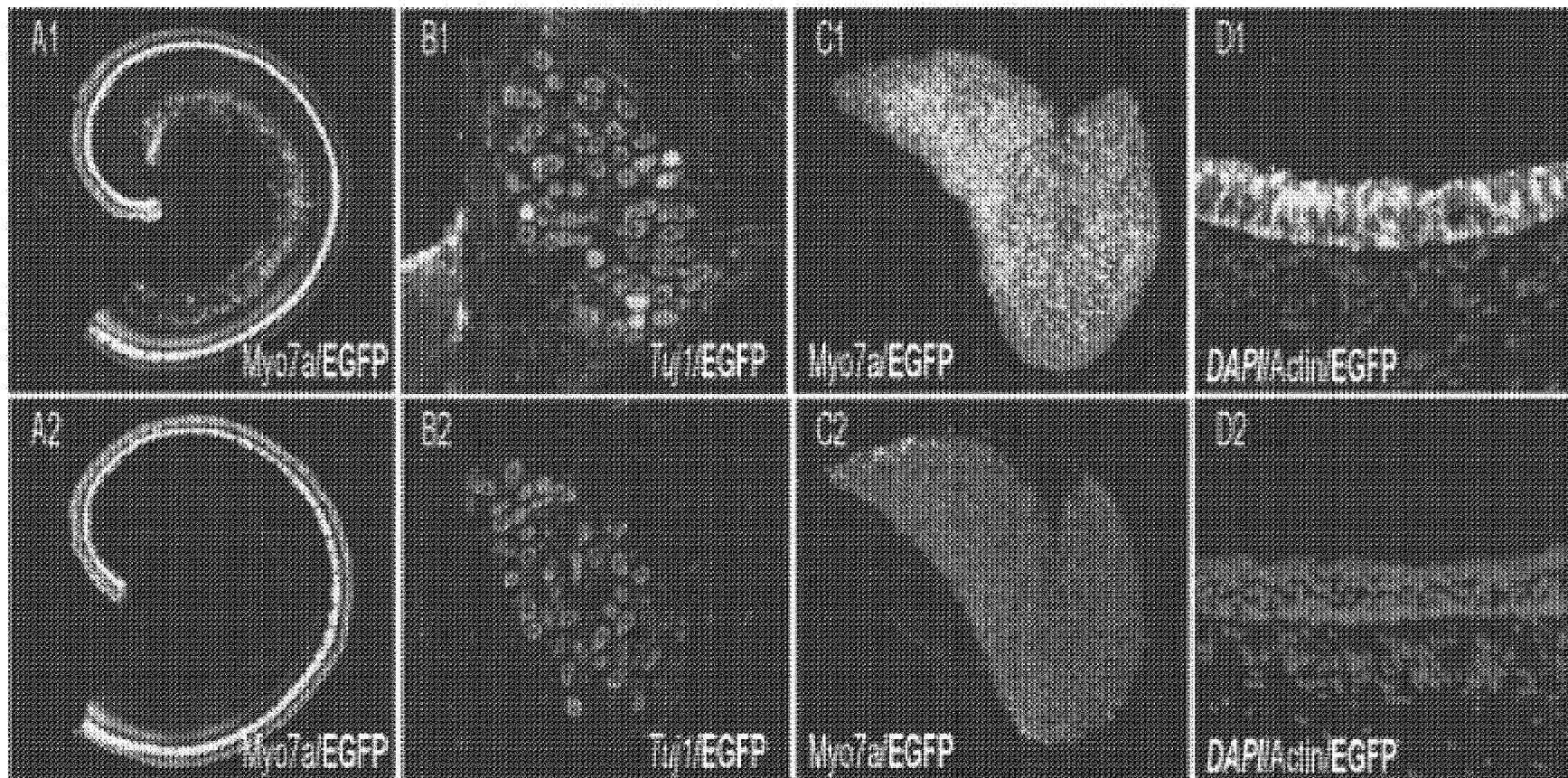


Фиг. 13



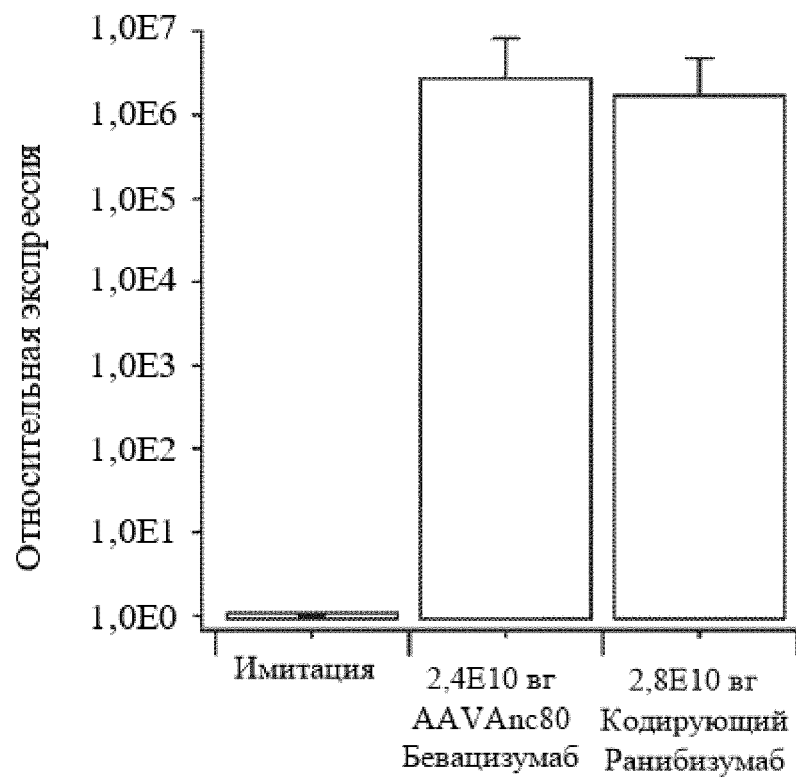
Фиг. 14

AAVnc80

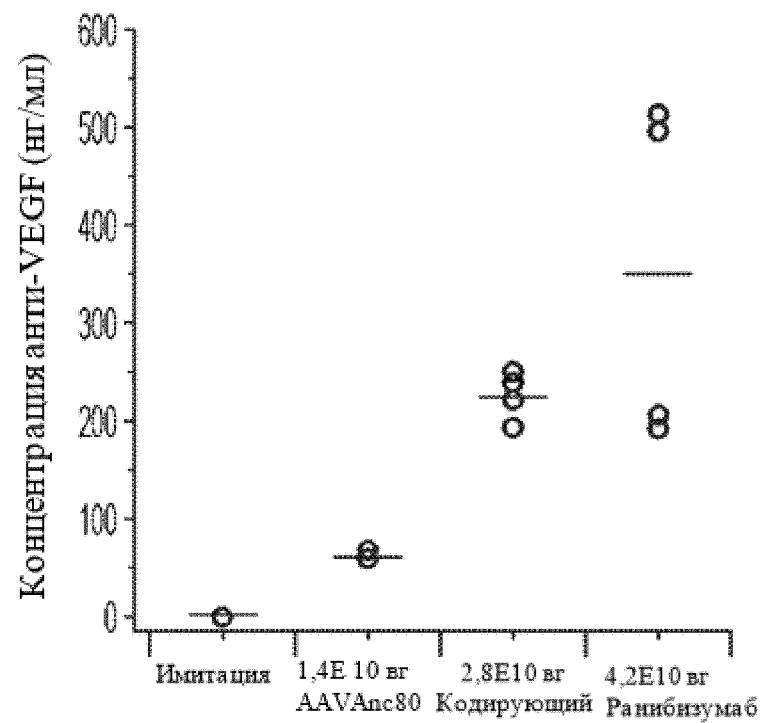


AAV2

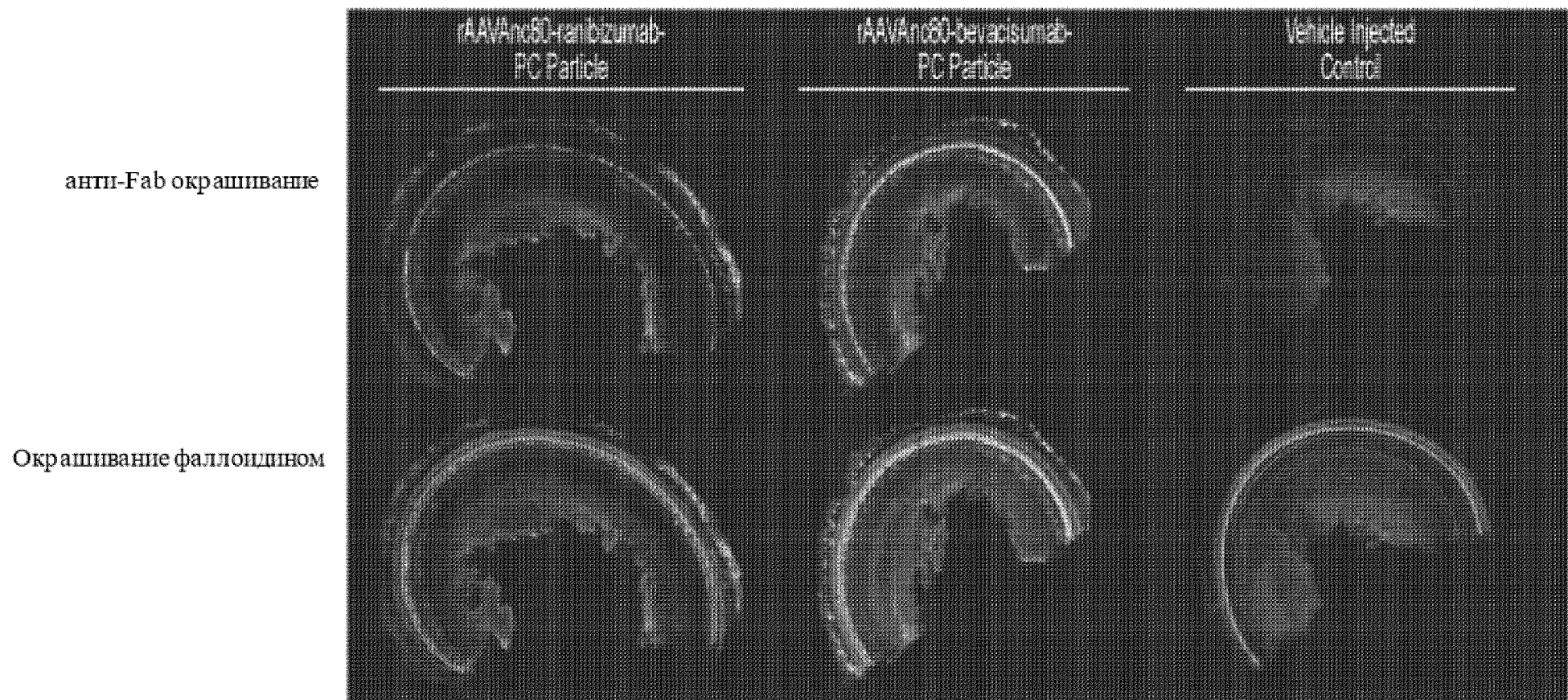
Фиг. 15



Фиг. 16А



Фиг. 16В



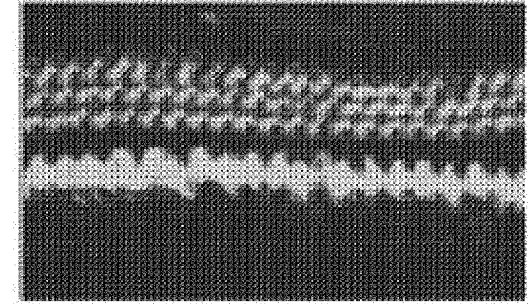
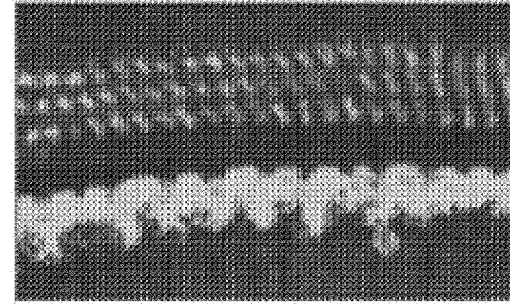
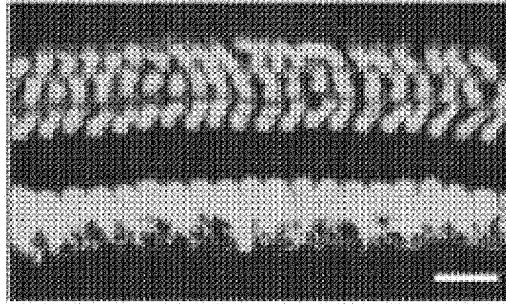
Фиг. 17

8 кГц

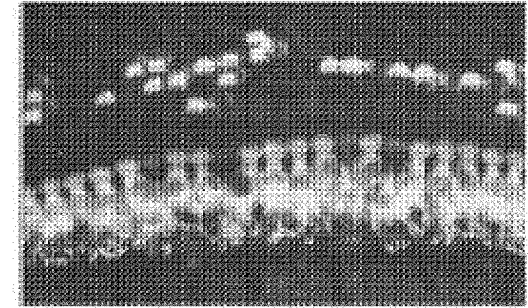
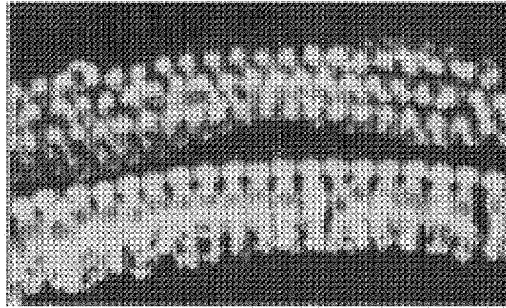
16 кГц

32 кГц

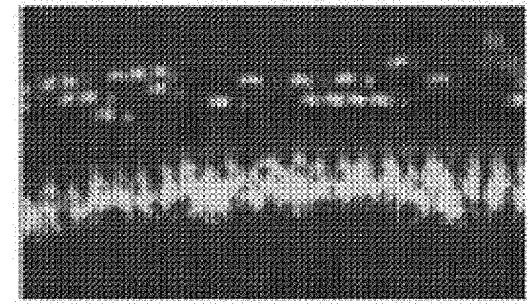
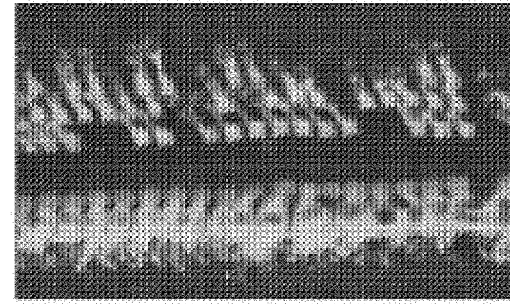
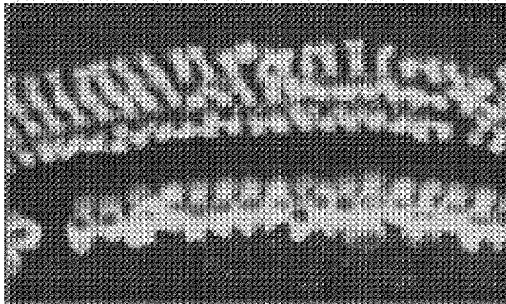
Контрольное ухо, в
которое не проводили
инъекцию



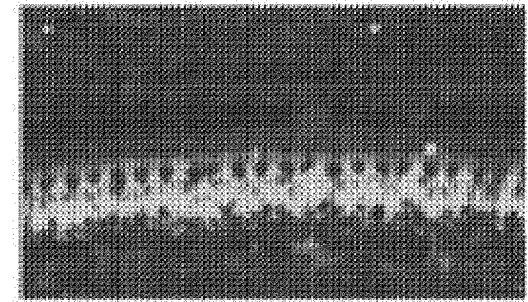
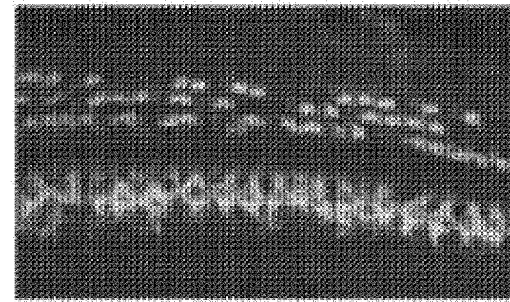
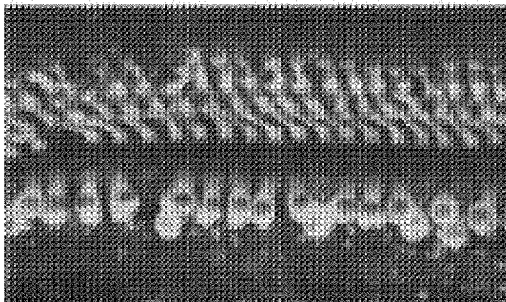
Контрольное ухо, в
которое
проводили инъекцию
несущей среды



гAAV Δ nc80-
ранибизумаб-PC
в количестве 1,4E10
вг/улитку

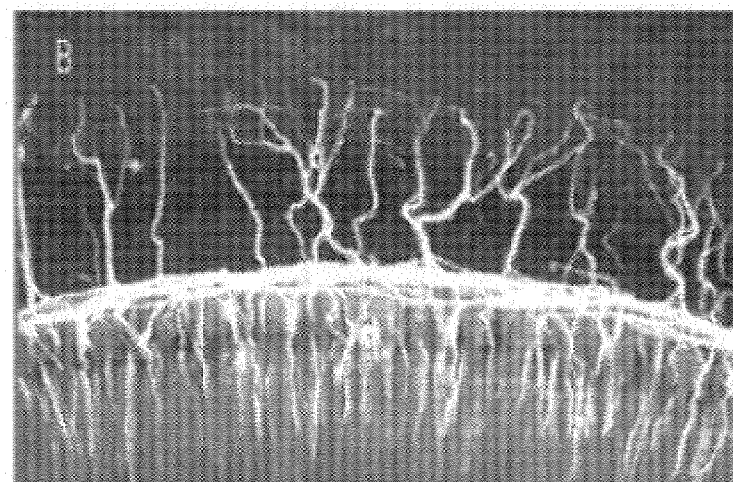
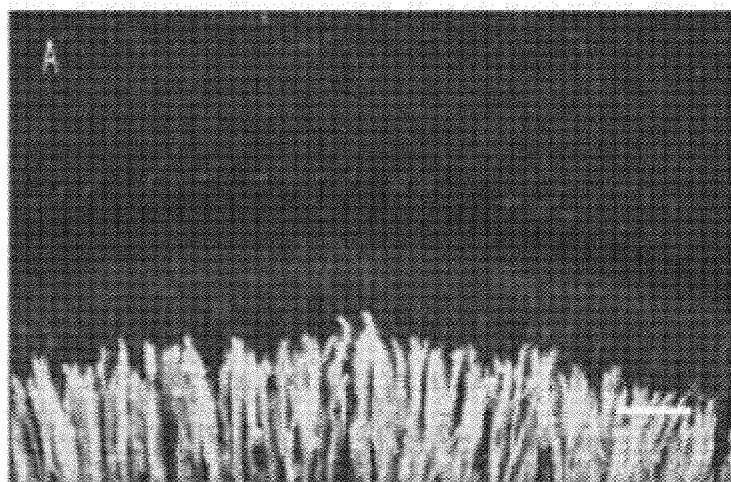


гAAV Δ nc80-
бевацизумаб-PC
в количестве 1,2E10
вг/улитку

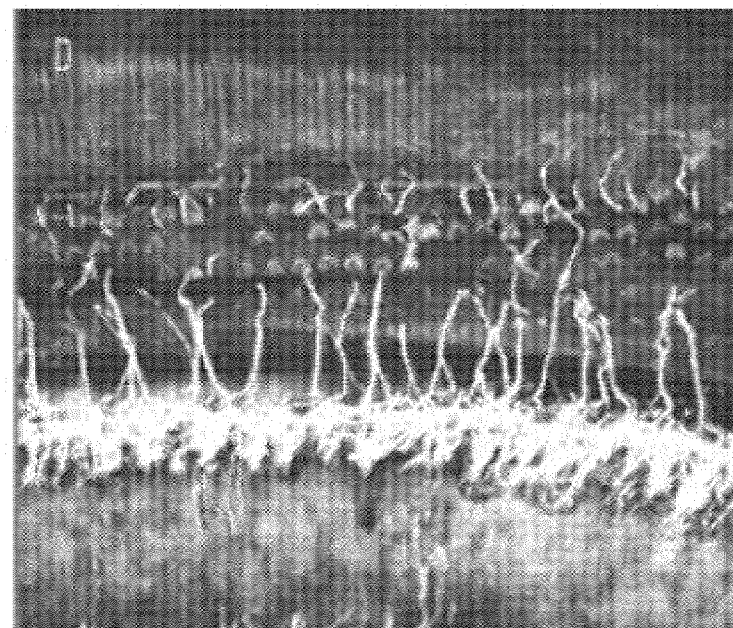
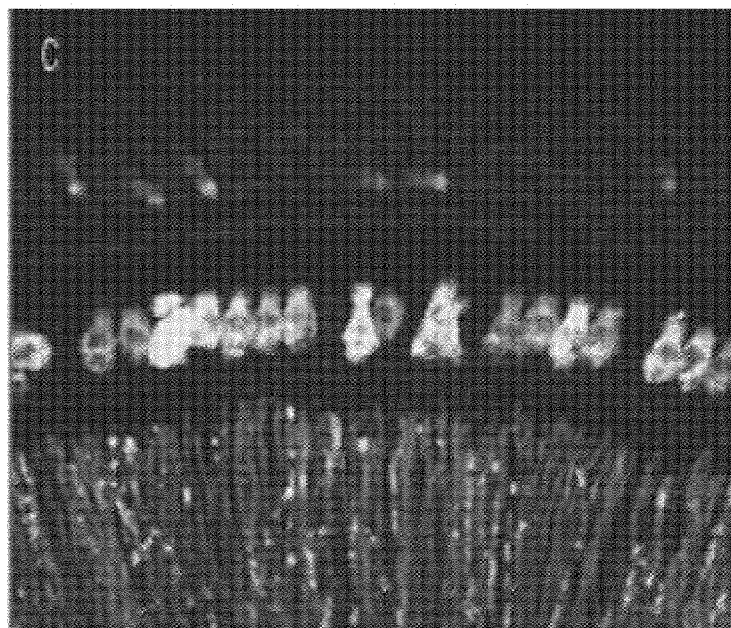


Фиг. 18

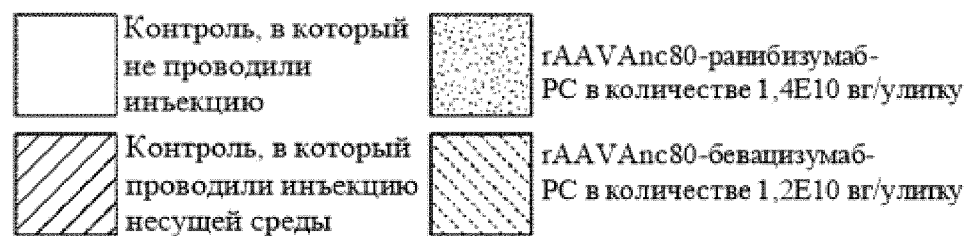
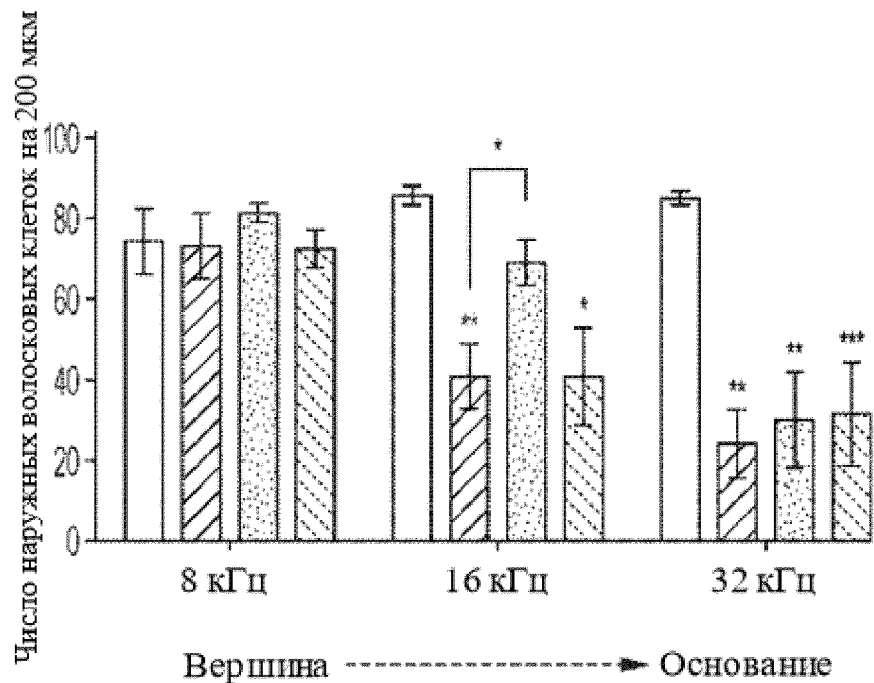
Контроль, в который
проводили инъекцию
несущей среды



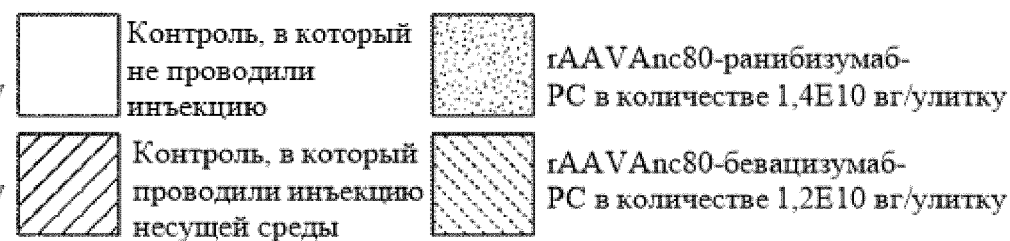
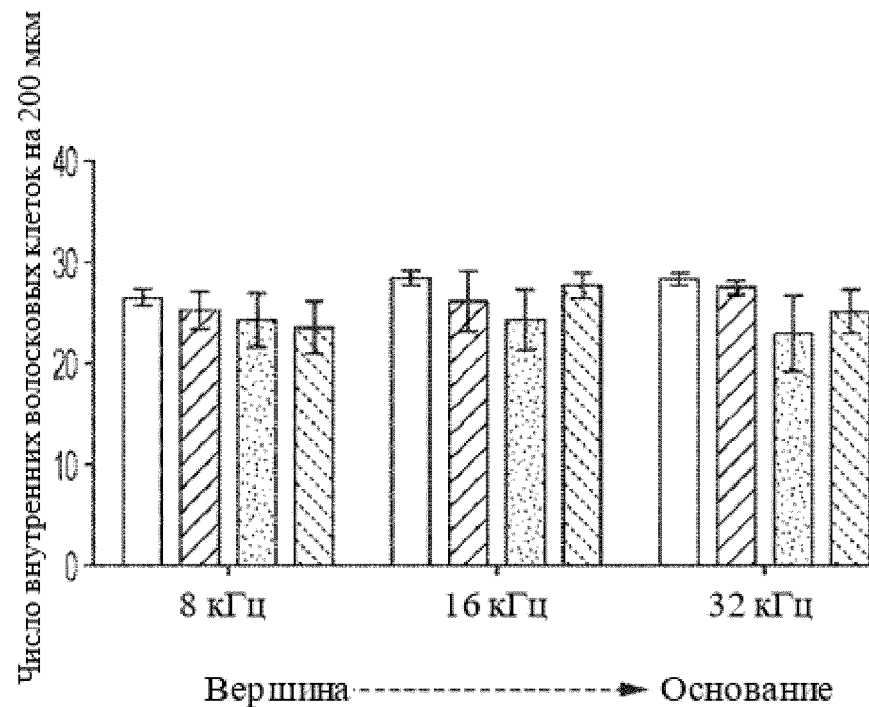
гAAVanc80-
ранибизумаб-
РС в количестве
1,4E10 вг/улитку



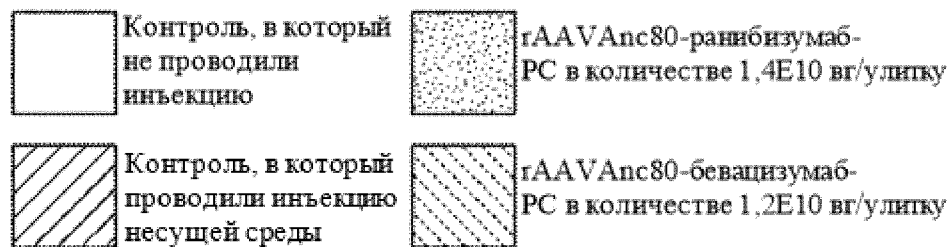
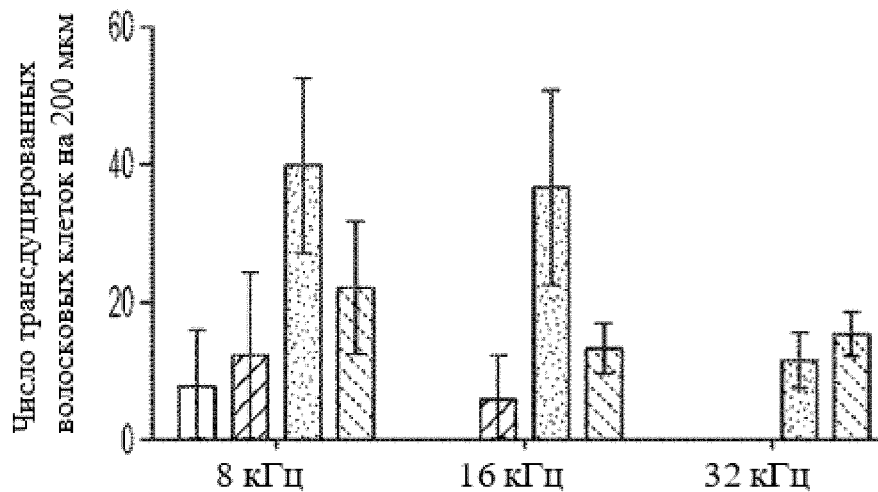
Фиг. 19



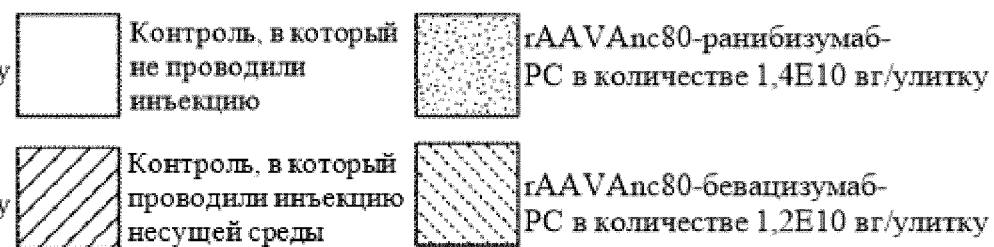
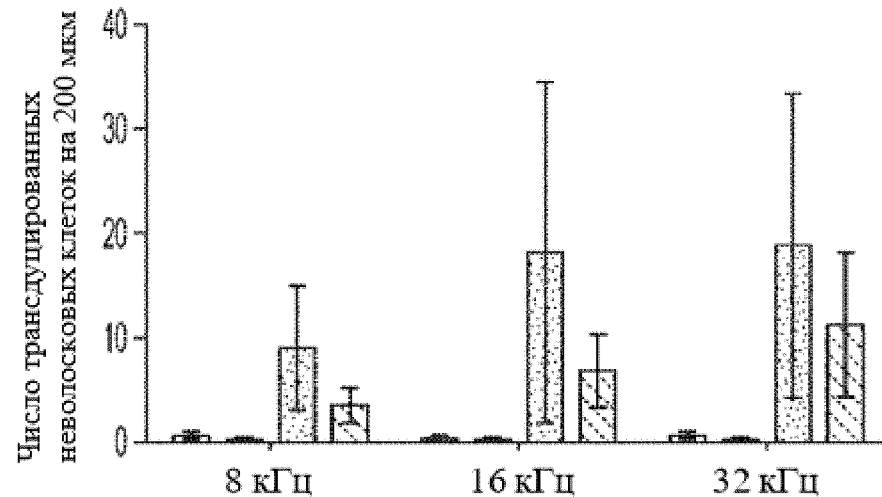
Фиг. 20А



Фиг. 20В

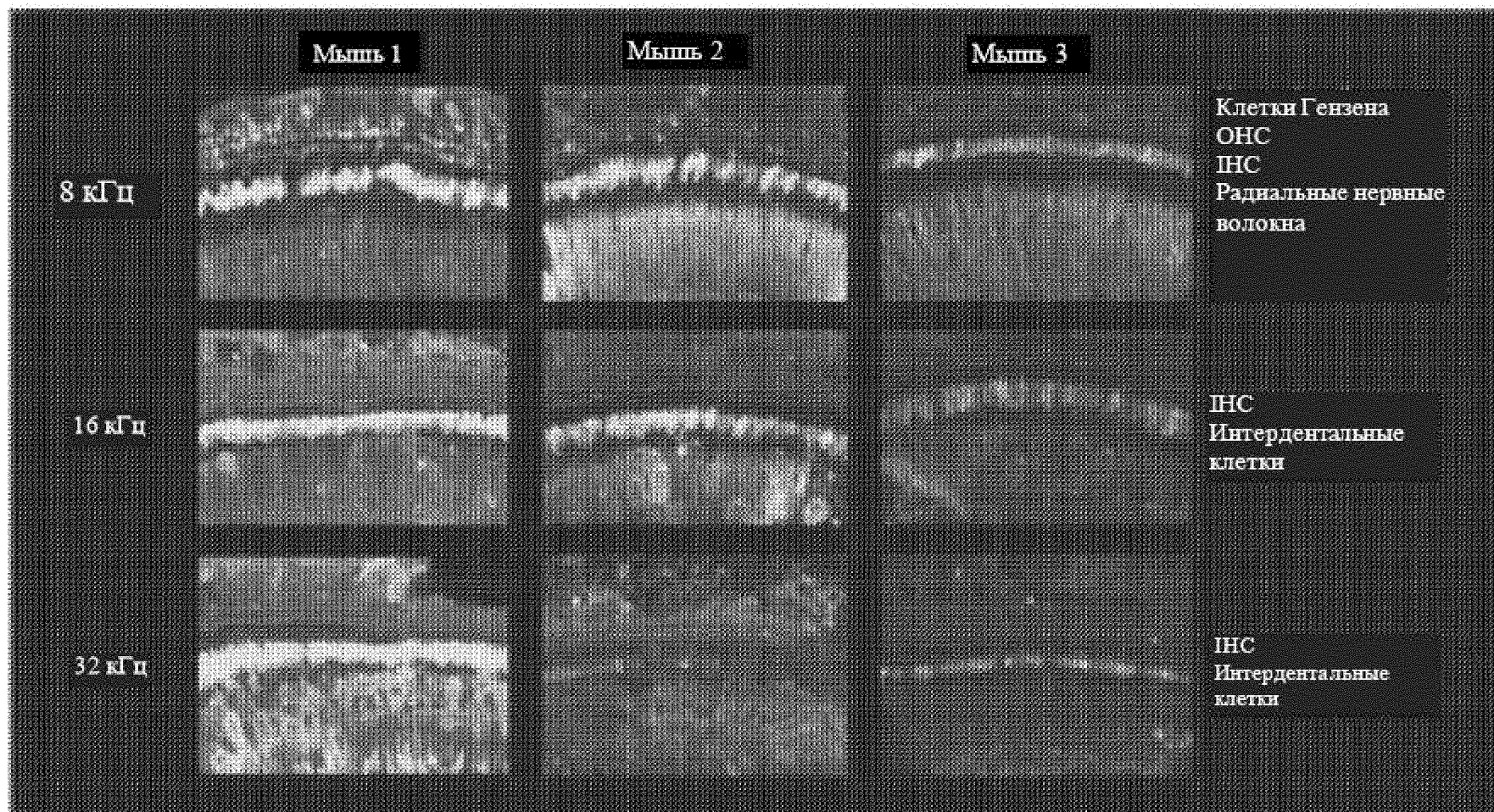


Фиг.21А

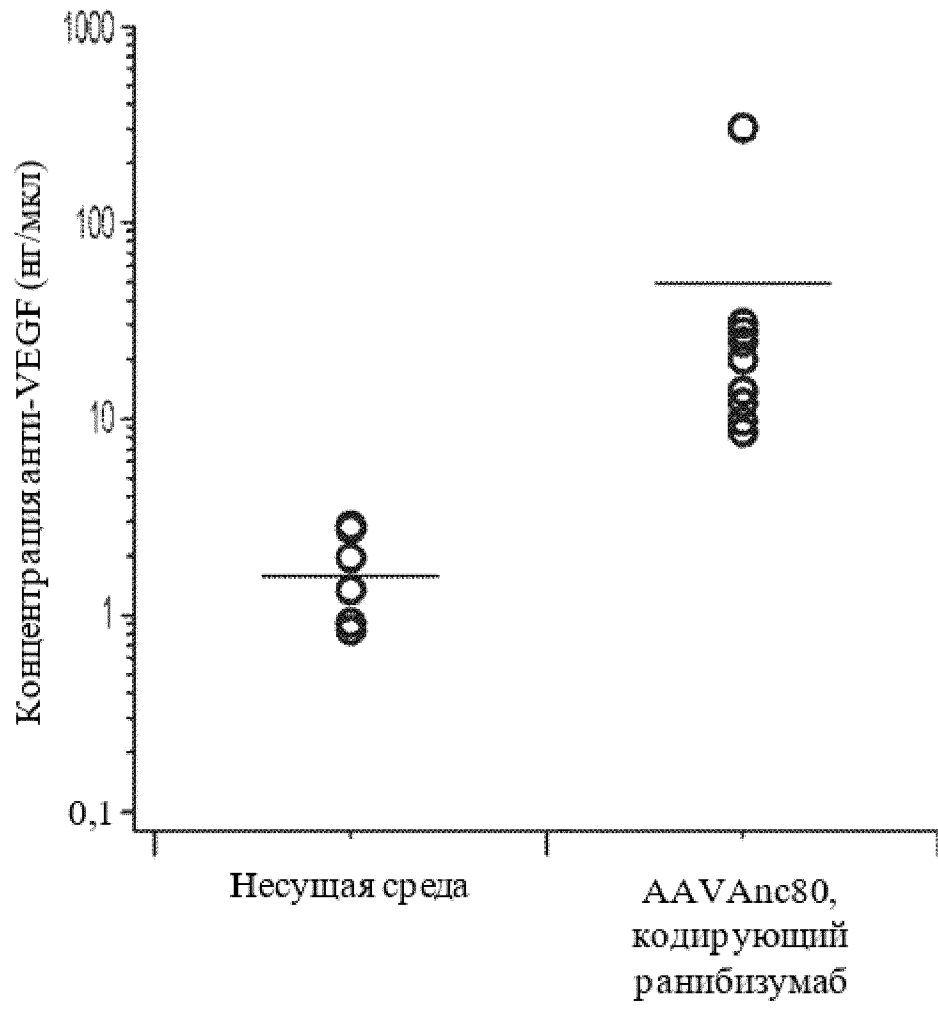


Фиг. 21В

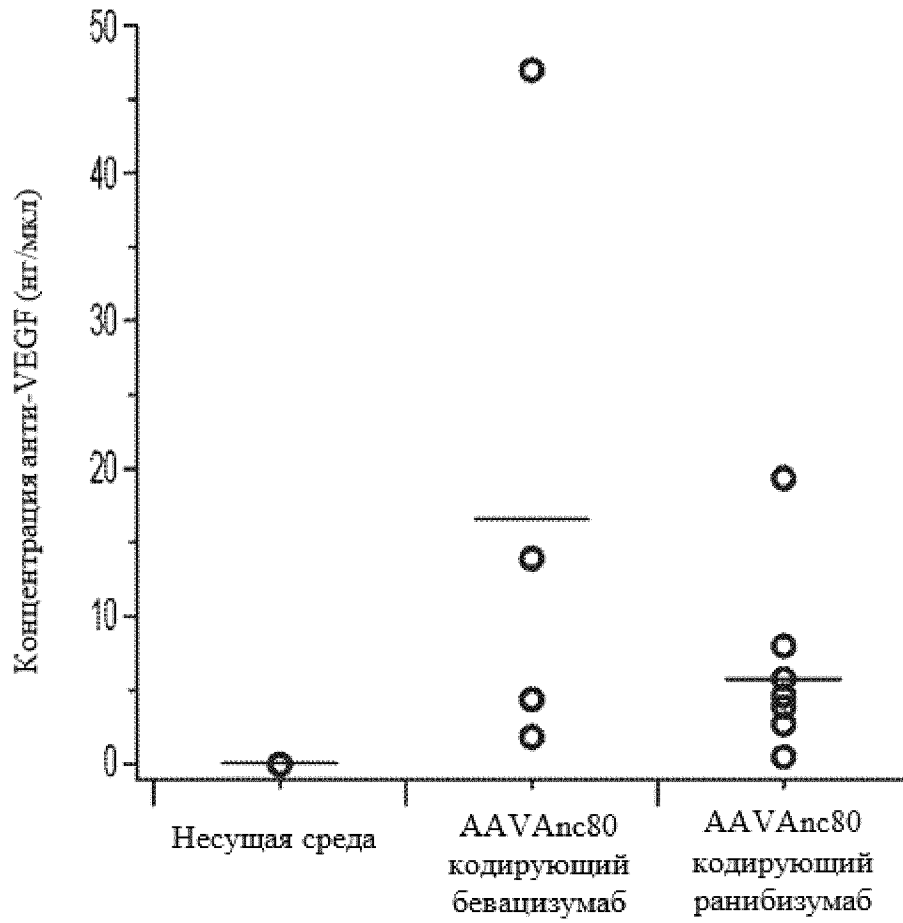
гAAVanc80-HCLC в количестве $1,4E10$ вг/улирку



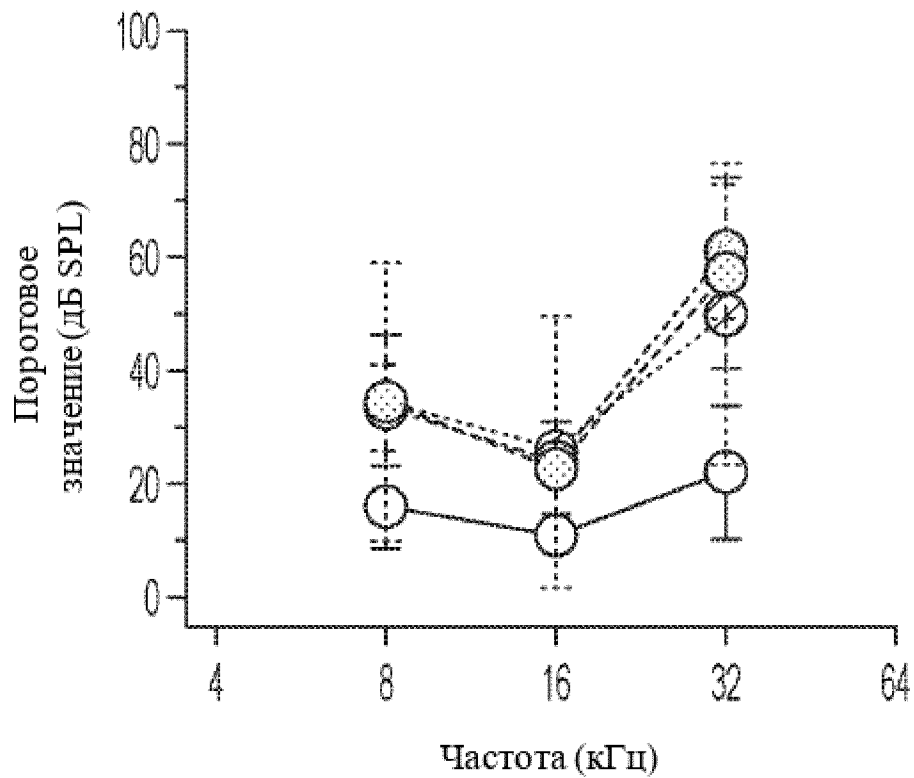
Фиг. 22



Фиг. 23

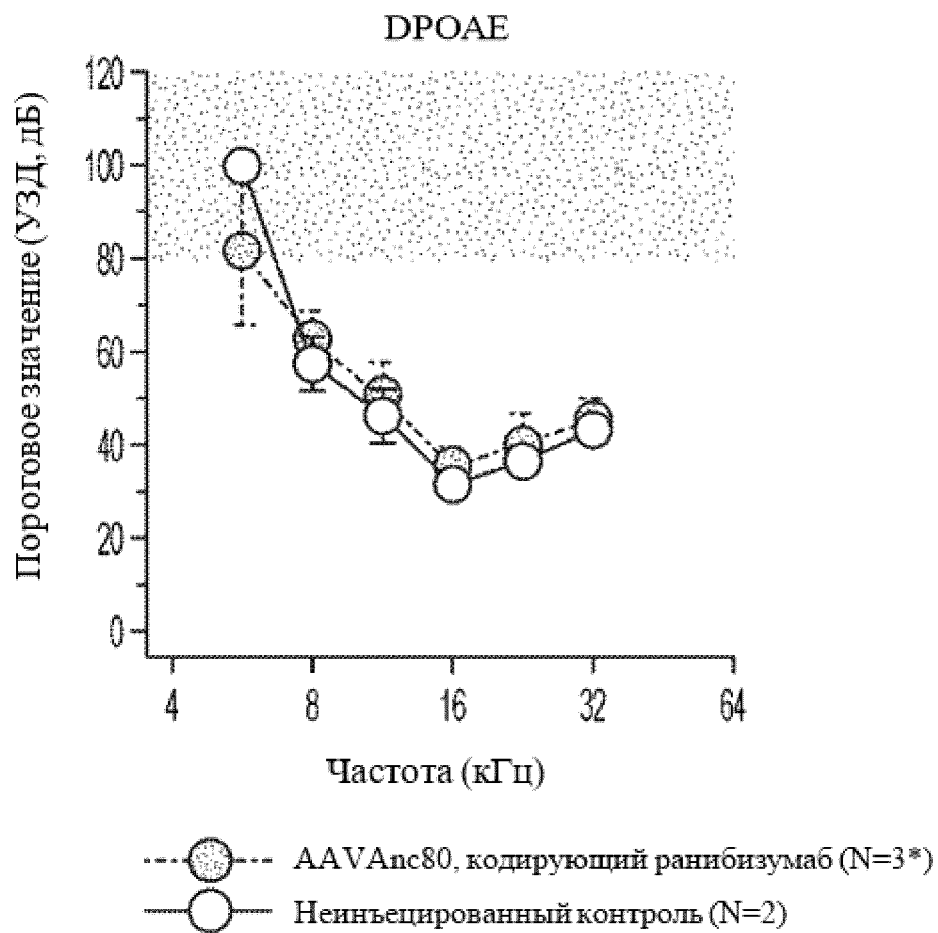


Фиг. 24

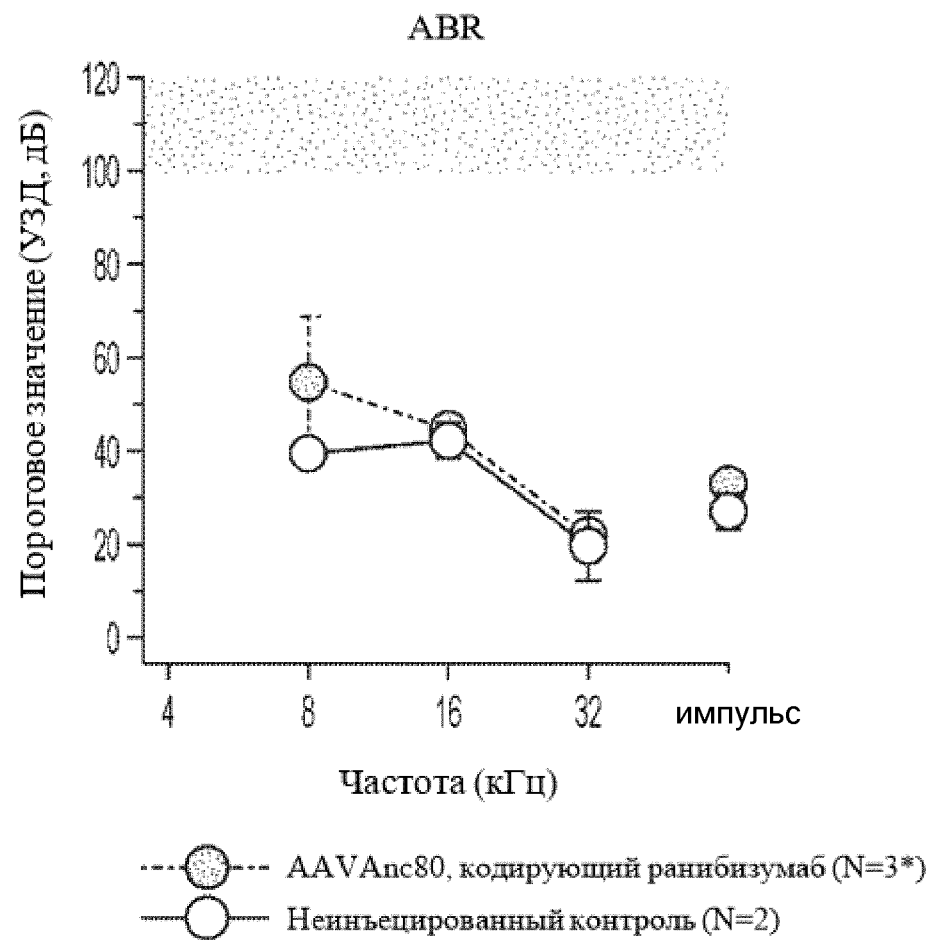


- AAVAnc80, кодирующий ранибизумаб (N=10)
- AAVAnc80, кодирующий бевацизумаб (N=10)
- Контроль несущей средой (N=10)
- Исходный уровень (N=30)

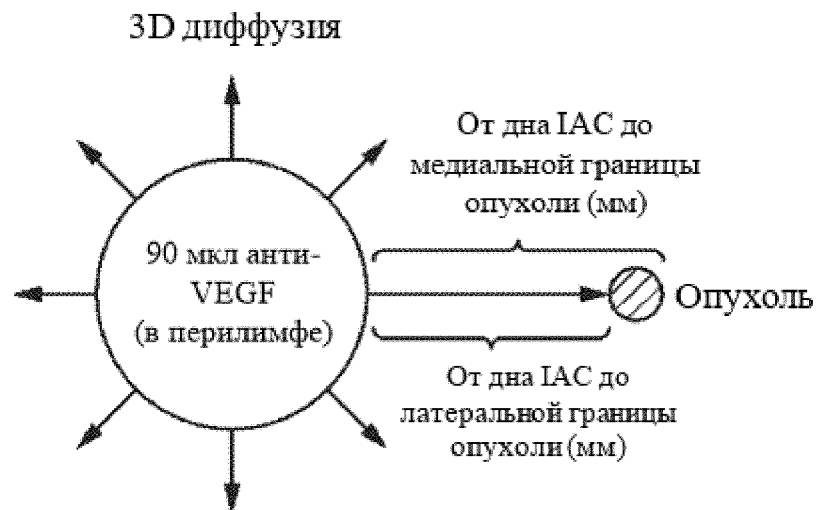
Фиг. 25



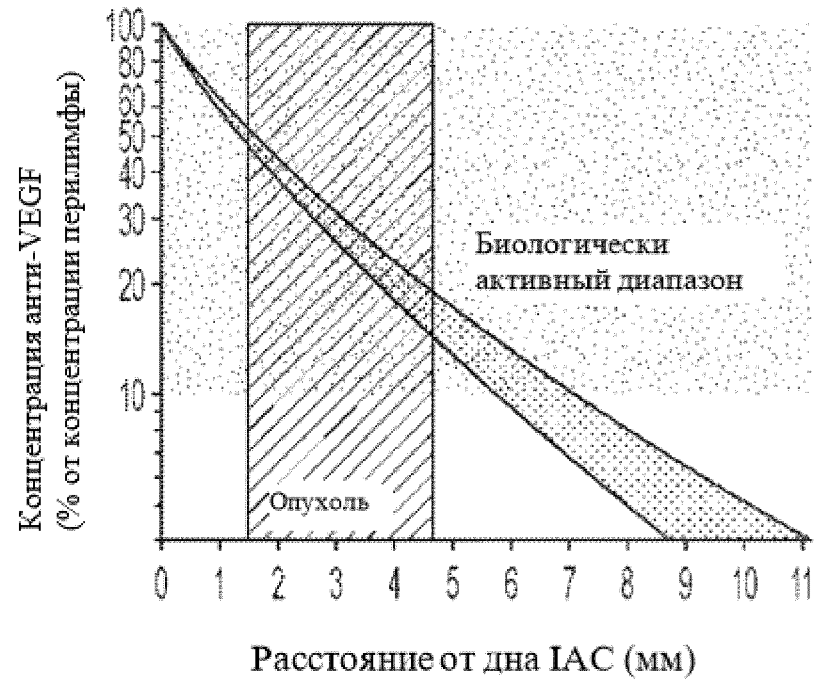
Фиг. 26А



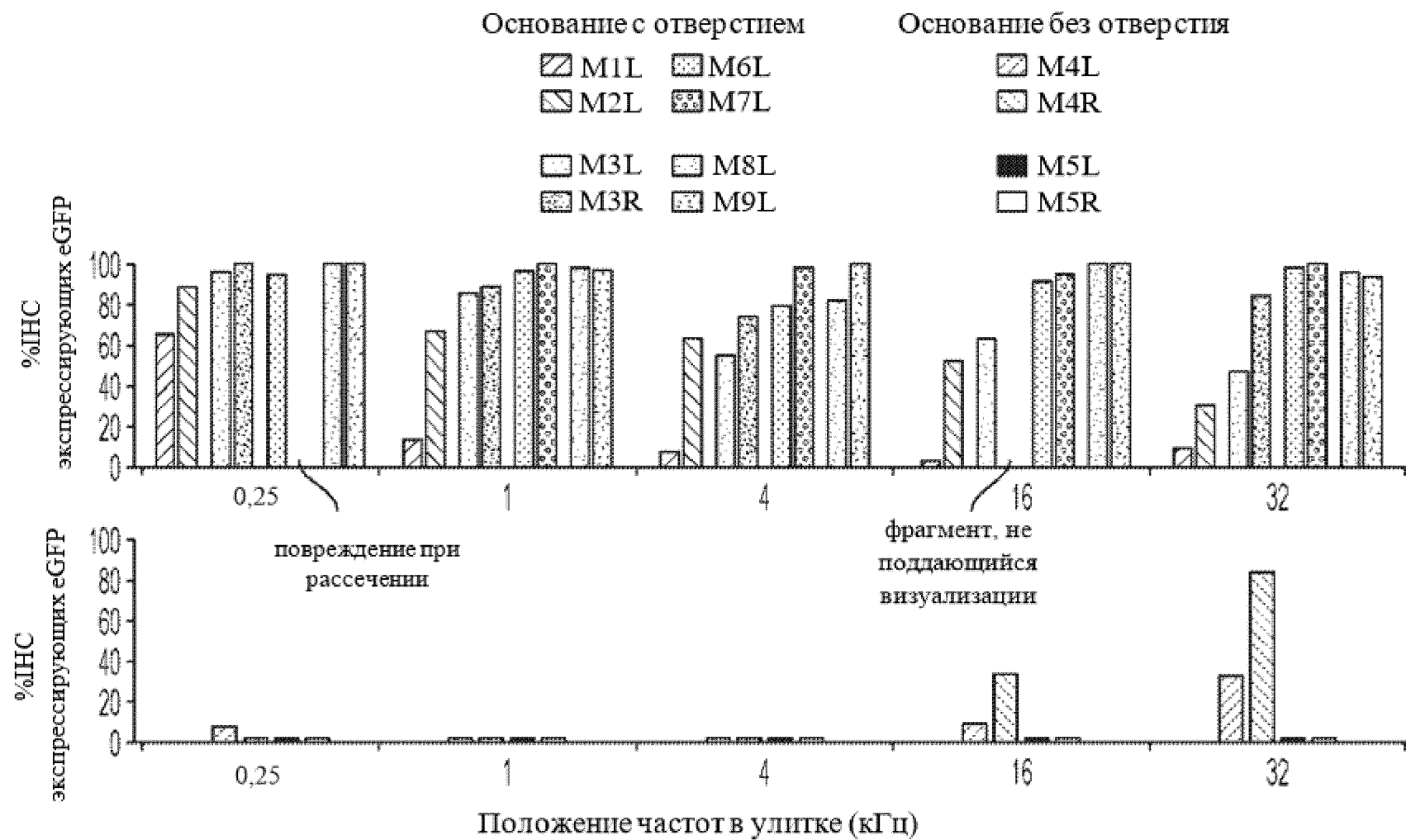
Фиг. 26В



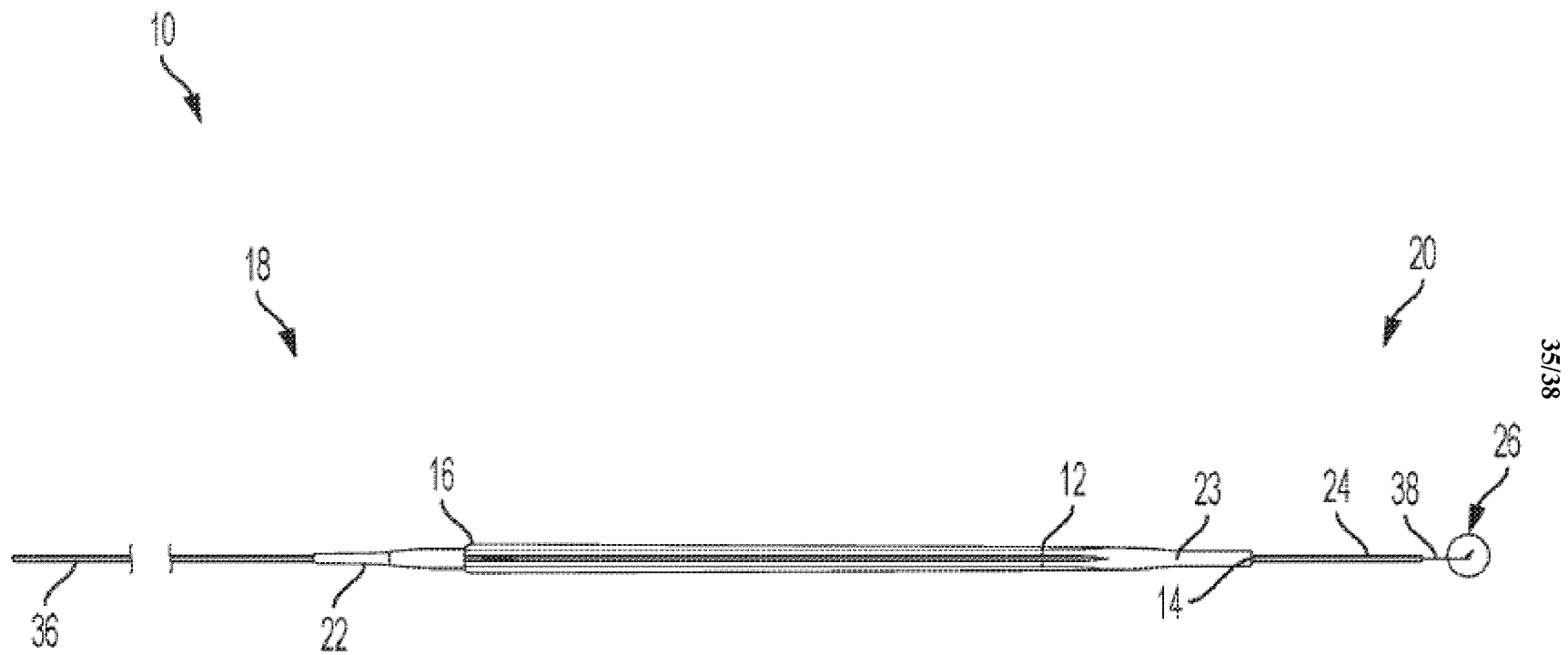
Фиг. 27А



Фиг. 27В

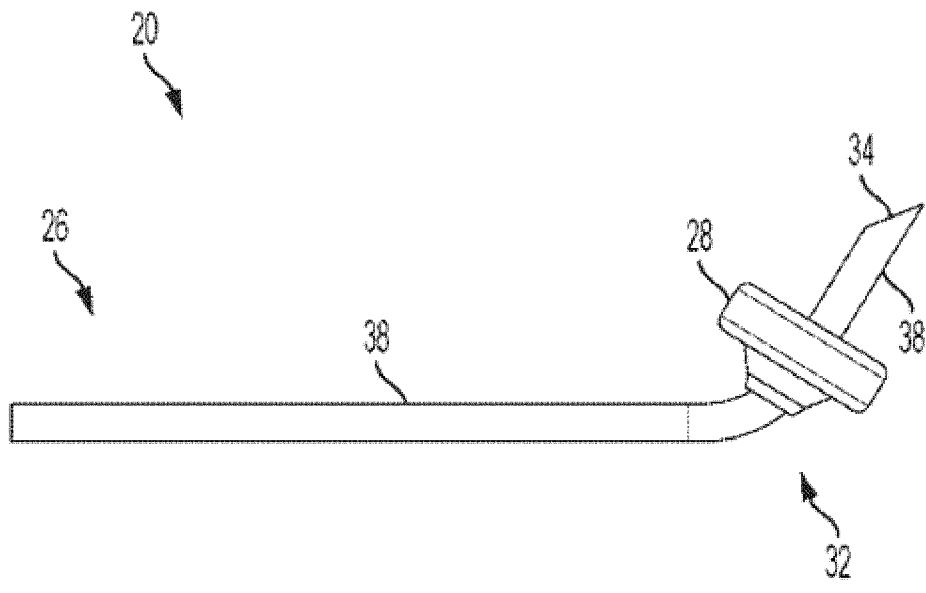


Фиг. 28

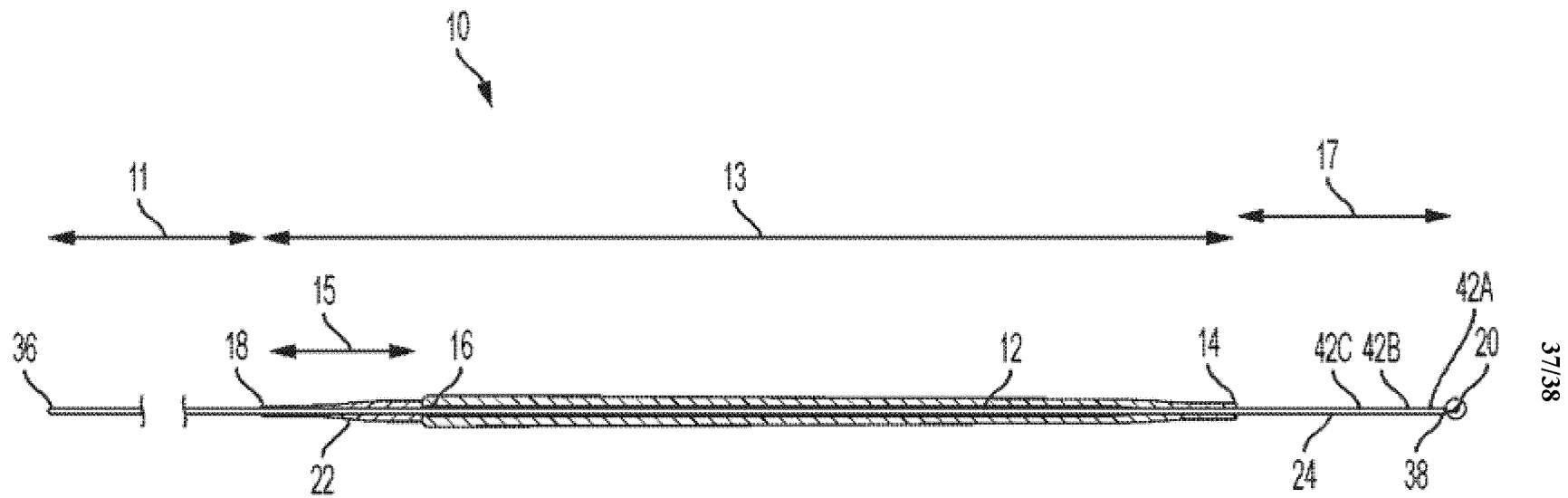


35/38

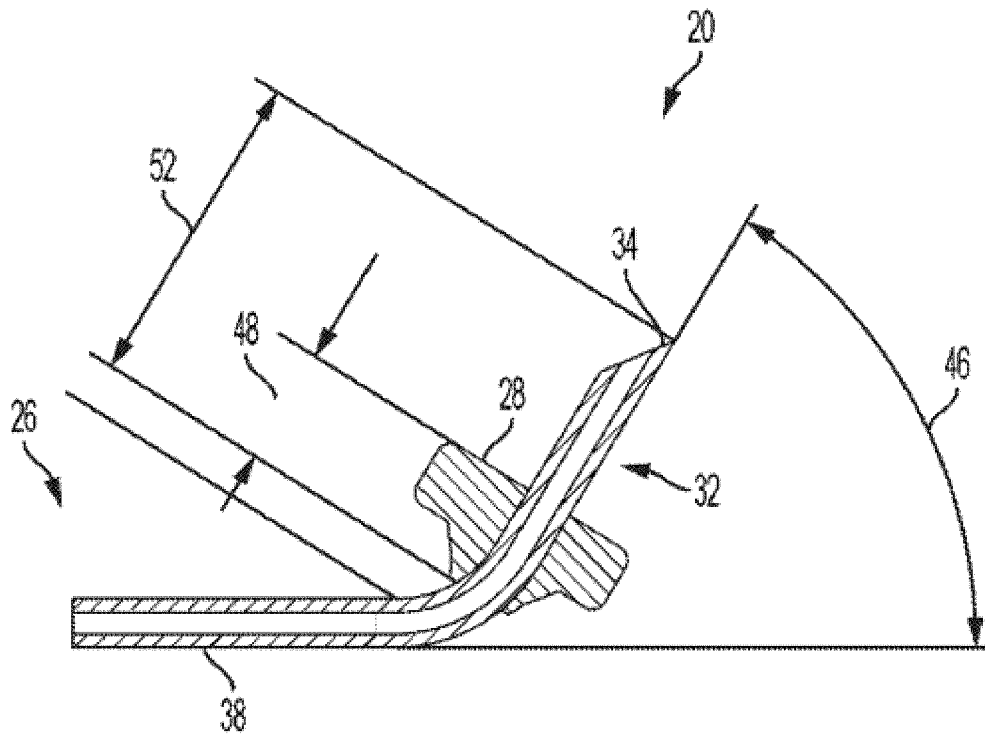
Фиг. 29



Фиг. 30



Фиг. 31



Фиг. 32