

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ МОДИФИЦИРОВАННОГО КАПСИДА АДЕНОАССОЦИИРОВАННОГО ВИРУСА

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящая заявка относится к области генной терапии и молекулярной биологии. Более конкретно, настоящее изобретение относится к способу получения модифицированного капсида аденоассоциированного вируса (AAV) и модифицированному капсиду AAV, полученному данным способом, а также к выделенной нуклеиновой кислоте, кодирующей данный модифицированный капсид, и вектору на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса для доставки субъекту гетерологичной последовательности нуклеиновой кислоты, который включает данный модифицированный капсид.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Аденоассоциированный вирус (AAV) представляет собой небольшой (25 нм), неспособный к самостоятельной репликации, безоболочечный вирус. У человека и приматов описано множество различных серотипов AAV. Геном аденоассоциированного вируса содержит (+ или -) одноцепочечную ДНК (ssDNA) длиной около 4,7 тысяч нуклеотидов. На концах молекулы геномной ДНК располагаются инвертированные концевые повторы (англ. inverted terminal repeats, ITRs). Геном содержит две открытые рамки считывания (англ. ORF): Rep и Cap, содержащие в себе несколько альтернативных рамок считывания, кодирующих различные белковые продукты. Продукты Rep имеют важное значение для репликации AAV, при этом ген Cap, помимо других альтернативных продуктов, кодирует 3 капсидных белка (VP1, VP2 и VP3). Белки VP1, VP2 и VP3 находятся в соотношении 1:1:10, образуя икосаэдрический капсид (Xie Q. et al. The atomic structure of adeno-associated virus (AAV-2), a vector for human gene therapy. Proc Natl Acad Sci USA, 2002; 99:10405-10410). При образовании рекомбинантного вектора AAV (rAAV) кассета экспрессии, фланкированная ITR, упаковывается в капсид AAV. Гены, необходимые для репликации AAV, не входят в кассету. Рекомбинантный AAV считается самым безопасным и одним из наиболее широко используемых вирусных векторов для переноса генов *in vivo*. Векторы могут инфицировать клетки множества типов тканей, обеспечивая эффективную и устойчивую экспрессию трансгена. Они также являются непатогенными и имеют низкий профиль иммуногенности (High KA et al., «rAAV human trial experience» Methods Mol Biol. 2011; 807:429-57).

Одной из насущных целей исследований в области разработки эффективной генотерапии является оптимизация векторов для улучшения тех или иных свойств данных векторов.

Известно, что различные серотипы AAV характеризуются сродством к различным рецепторам на поверхности клеток-хозяев, к которым они обладают тропизмом. Так основным известным рецептором для AAV2 является гепарансульфат-протеогликан, корецепторами выступают интегриновый гетеродимер $\alpha V\beta 5$, рецептор фактора роста фибробластов первого типа и рецептор фактора роста гепатоцитов, c-Met. AAV12 связывается с гепарансульфат-протеогликанами и сиаловой кислотой. AAV4 и AAV5 связываются с N- и O-связанными сиаловыми кислотами соответственно. AAV5 задействует рецептор фактора роста тромбоцитов. При этом установлена связь между аминокислотной последовательностью белков капсида AAV с процессом его сборки, инкапсидирования генома и сродством к различным типам рецепторов, репрезентированных на поверхности клеток-хозяев (Govindasamy L. et. al. Structural insights into adeno-associated virus serotype 5. J Virol. 2013 Oct;87(20):11187-99).

В международной заявке WO2012145601 описаны вирионы аденоассоциированного вируса (AAV) с вариантным капсидным белком, где вирионы AAV демонстрируют большую инфекционность ретинальных клеток, когда вводятся интравитреальной инъекцией, по сравнению с AAV дикого типа.

В международной заявке WO2013158879 описан вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV) для доставки субъекту гетерологичной последовательности нуклеиновой кислоты, содержащей капсидный белок VP1, который содержит одну или несколько замен лизина, где одна замена лизина представляет K137R, где упомянутая замена лизина является эффективной для ингибирования убиквитинилирования упомянутого капсидного белка, и тем самым увеличивается трансдукция упомянутого вектора AAV в клетке-мишени.

На данный момент существует потребность в AAV с улучшенными свойствами по сравнению с AAV дикого типа, например, которые обладают увеличенной трансдуцирующей способностью, большей специфичной способностью трансдуцировать клетки целевых органов и тканей, увеличенной емкостью капсида, увеличенной эффективностью упаковки вирусных геномов AAV, а также увеличенной эффективностью наработки за счет высокоэффективной продукции (сборки) инкапсидированных вирусных векторов на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV).

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Авторами изобретения было установлено, что способ получения модифицированного капсида аденоассоциированного вируса (AAV) по изобретению позволяет неожиданно получить модифицированный капсид AAV, который обладает одним или несколькими улучшенными свойствами по сравнению с капсидом AAV без данных модификаций (дикого типа), которые выбирают из группы:

- увеличение эффективности трансдукции клеток,
- увеличение продукции целевого белка,
- увеличение эффективности наработки за счет высокоэффективной продукции (сборки) инкапсидированных вирусных векторов на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV).

Краткое описание изобретения

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу получения модифицированного капсида AAV, который включает:

а) определение аминокислот белка-капсомера модифицируемого AAV, расположенных в области интерфейса взаимодействия соседних пентамерных субъединиц капсида;

б) структурное выравнивание модифицируемого капсида AAV с капсидом-шаблоном для определения попарного соответствия между каждой аминокислотой модифицируемого AAV из области интерфейса взаимодействия между соседними пентамерными субъединицами и ближайшей к ней аминокислотой капсида-шаблона, как структурного аналога исходной аминокислоты, которая рассматривается в качестве потенциальной замены,

где под капсидом-шаблоном понимают схожий по строению капсид вируса, выбранного из семейства парвовирусов (Parvoviridae), который не является AAV;

в) попарное сравнение определенных на стадии б) остатков аминокислот капсида AAV и капсида-шаблона для выявления структурных различий капсида модифицируемого AAV и капсида-шаблона в области интерфейса взаимодействия соседних пентамерных субъединиц капсида;

г) выбор позиций для мутагенеза, при этом аминокислотные остатки для мутагенеза находятся в области интерфейса взаимодействия соседних пентамерных субъединиц капсида модифицируемого AAV и имеют структурное различие между капсидом модифицируемого AAV и капсидом-шаблоном в области интерфейса взаимодействия соседних пентамерных субъединиц капсида;

д) выбор аминокислотного остатка для мутагенеза в позиции, выбранной на стадии г), с использованием одного из следующих принципов:

- замена исходной аминокислоты в белке-капсомере модифицируемого AAV на аминокислоту, которая имеет больший объем, за исключением цистеина и метионина;

- замена исходной аминокислоты в белке-капсомере модифицируемого AAV на аминокислоту, которая имеет увеличенное или уменьшенное число полярных контактов между капсомерами, за исключением цистеина и метионина;

- е) введение одной или нескольких аминокислотных замен, выбранных на стадиях г)-д), в области интерфейса взаимодействия соседних пентамерных субъединиц капсида модифицируемого AAV.

В некоторых вариантах осуществления изобретения способ получения модифицированного капсида AAV дополнительно включает проверку полученных на стадии е) модифицированных капсидов AAV с одной или несколькими аминокислотными заменами на наличие одного или нескольких улучшенных свойств по сравнению с капсидом AAV без данных модификаций, где одно или несколько улучшенных свойств выбирают из группы:

- увеличение эффективности трансдукции клеток,

- увеличение продукции целевого белка,

- увеличение эффективности наработки за счет высокоэффективной продукции (сборки) инкапсидированных вирусных векторов на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV).

В некоторых вариантах осуществления изобретения способ получения модифицированного капсида AAV дополнительно включает проверку полученных на стадии е) модифицированных капсидов AAV на наличие одного или нескольких улучшенных свойств по сравнению с капсидом AAV без данных модификаций и отбор модифицированных капсидов AAV, которые имеют одно или несколько улучшенных свойств по сравнению с капсидом AAV без данных модификаций, где одно или несколько улучшенных свойств выбирают из группы:

- увеличение эффективности трансдукции клеток,

- увеличение продукции целевого белка,

- увеличение эффективности наработки за счет высокоэффективной продукции (сборки) инкапсидированных вирусных векторов на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV).

В некоторых вариантах осуществления способа получения капсида AAV капсид модифицируемого AAV выбирают из группы, включающей: AAV человека, AAV обезьян или AAV птиц.

В некоторых вариантах осуществления способа получения капсида AAV капсид модифицируемого AAV выбирают из группы, включающей следующие серотипы AAV: AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV13, AAV14, AAV15 или AAV16.

В некоторых вариантах осуществления способа получения капсида AAV схожий по строению капсид-шаблон, выбирают из группы, которая включает: парвовирус B19, человеческий бокавирус 1 (HBoV1), парвовирус крупного рогатого скота (BVP).

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к модифицированному капсиду AAV для получения вирусных векторов на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса, который получен способом, включающим:

а) определение аминокислот белка-капсомера модифицируемого AAV, расположенных в области интерфейса взаимодействия соседних пентамерных субъединиц капсида;

б) структурное выравнивание модифицируемого капсида AAV с капсидом-шаблоном для определения попарного соответствия между каждой аминокислотой модифицируемого AAV из области интерфейса взаимодействия между соседними пентамерными субъединицами и ближайшей к ней аминокислотой капсида-шаблона, как структурного аналога исходной аминокислоты, которая рассматривается в качестве потенциальной замены,

где под капсидом-шаблоном понимают схожий по строению капсид вируса, выбранного из семейства парвовирусов (Parvoviridae), который не является AAV;

в) попарное сравнение определенных на стадии б) остатков аминокислот капсида AAV и капсида-шаблона для выявления структурных различий капсида модифицируемого AAV и капсида-шаблона в области интерфейса взаимодействия соседних пентамерных субъединиц капсида;

г) выбор позиций для мутагенеза, при этом аминокислотные остатки для мутагенеза находятся в области интерфейса взаимодействия соседних пентамерных субъединиц капсида модифицируемого AAV и имеют структурное различие между капсидом модифицируемого AAV и капсидом-шаблоном в области интерфейса взаимодействия соседних пентамерных субъединиц капсида;

д) выбор аминокислотного остатка для мутагенеза в позиции, выбранной на стадии г), с использованием одного из следующих принципов:

-замена исходной аминокислоты в белке-капсомере модифицируемого AAV на аминокислоту, которая имеет больший объем, за исключением цистеина и метионина;

-замена исходной аминокислоты в белке-капсомере модифицируемого AAV на аминокислоту, которая имеет увеличенное или уменьшенное число полярных контактов между капсомерами, за исключением цистеина и метионина;

е) введение одной или нескольких аминокислотных замен, выбранных на стадиях г)-д), в области интерфейса взаимодействия соседних пентамерных субъединиц капсида модифицируемого AAV;

а также, при необходимости, дополнительно включает

ж) проверку полученных на стадии е) модифицированных капсидов AAV на наличие одного или нескольких улучшенных свойств по сравнению с капсидом AAV без данных модификаций и отбор модифицированных капсидов AAV, которые имеют одно или несколько улучшенных свойств по сравнению с капсидом AAV без данных модификаций, где одно или несколько улучшенных свойств выбирают из группы:

-увеличение эффективности трансдукции клеток,

-увеличение продукции целевого белка,

-увеличение эффективности наработки за счет высокоэффективной продукции (сборки) инкапсидированных вирусных векторов на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV).

В некоторых вариантах осуществления модифицированного капсида AAV капсид модифицируемого AAV выбирают из группы, включающей: AAV человека, AAV обезьян или AAV птиц.

В некоторых вариантах осуществления модифицированного капсида AAV капсид модифицируемого AAV выбирают из группы, включающей следующие серотипы AAV: AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV13, AAV14, AAV15 или AAV16.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к модифицированному капсиду AAV для получения вирусных векторов на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса, который включает модифицированный белок VP1 капсида AAV, который имеет аминокислотную последовательность, которую выбирают из группы: SEQ ID No: 14, 20, 26, 32, 38, 44, 50, 56, 62, 68, 74, 80, 86, 92, 98, 104, 110, 116, 122, 128, 134, 140, 146, 152, 158, 164, 170, 176, 182, 188, 194, 200, 206, 212, 218, 224, 230, 236, 242, 248, 254, 260, 266, 272, 278, 284, 290, 296, 302, 308, 314, 320, 326, 332, 338, 344, 350, 356, 362 или 368.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает:

а) модифицированный белок VP1 капсида AAV, который имеет аминокислотную последовательность, которую выбирают из группы: SEQ ID No: 14, 20, 26, 32, 38, 44, 50, 56, 62, 68, 74, 80, 86, 92, 98, 104, 110, 116, 122, 128, 134, 140, 146, 152, 158, 164, 170, 176, 182, 188, 194, 200, 206, 212, 218, 224, 230, 236, 242, 248, 254, 260, 266, 272, 278, 284, 290, 296, 302, 308, 314, 320, 326, 332, 338, 344, 350, 356, 362 или 368;

б) соответствующий своему белку VP1 модифицированный белок VP2 капсида AAV, который имеет аминокислотную последовательность, которую выбирают из группы: SEQ ID No: 16, 22, 28, 34, 40, 46, 52, 58, 64, 70, 76, 82, 88, 94, 100, 106, 112, 118, 124, 130, 136, 142, 148, 154, 160, 166, 172, 178, 184, 190, 196, 202, 208, 214, 220, 226, 232, 238, 244, 250, 256, 262, 268, 274, 280, 286, 292, 298, 304, 310, 316, 322, 328, 334, 340, 346, 352, 358, 364 или 370;

в) соответствующий своему белку VP1 модифицированный белок VP3 капсида AAV, который имеет аминокислотную последовательность, которую выбирают из группы: SEQ ID No: 18, 24, 30, 36, 42, 48, 54, 60, 66, 72, 78, 84, 90, 96, 102, 108, 114, 120, 126, 132, 138, 144, 150, 156, 162, 168, 174, 180, 186, 192, 198, 204, 210, 216, 222, 228, 234, 240, 246, 252, 258, 264, 270, 276, 282, 288, 294, 300, 306, 312, 318, 324, 330, 336, 342, 348, 354, 360, 366 или 372.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к выделенной нуклеиновой кислоте, которая кодирует любой из вышеуказанных модифицированных капсидов.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к вектору на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса для доставки субъекту гетерологичной последовательности нуклеиновой кислоты, который включает:

- 1) любой из вышеуказанных модифицированных капсидов, и
- 2) гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую регуляторные последовательности, которые обеспечивают экспрессию продукта, кодируемого гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты, в целевых клетках.

В некоторых вариантах осуществления изобретения вектор на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса имеет продукт экспрессии гетерологичной последовательности нуклеиновой кислоты, который представляет собой терапевтический полипептид или репортерный полипептид.

Краткое описание чертежей

Фигура 1 представляет собой кольцевую схему плазмиды pAAV-linker, которая предназначена для клонирования библиотек случайных вариантов гена капсида AAV.

GFP- последовательность, кодирующая зеленый флуоресцентный белок,

PolyA – сигнал полиаденилирования,

ITR - инвертированный концевой повтор аденоассоциированного вируса,

T2A – последовательность, кодирующая пептид способный к самовырезанию из полипептидной цепи получен от вируса *thossea asigna*,

HBG intron - интрон бета-глобина человека,

CMVpromoter - промотор цитомегаловируса человека,

AmpR- последовательность гена бета-лактамазы обеспечивающая устойчивость *E.coli* к ампициллину,

pUC origin – высококопийный ориджин репликации бактерий,

EcoRI - сайт узнавания эндонуклеазой рестрикции EcoRI,

AscI - сайт узнавания эндонуклеазой рестрикции AscI.

Фигура 2 представляет собой кольцевую схему плазмиды pAAV-Rep, которая предназначена для наработки рекомбинантных вирусных препаратов дикого типа AAV из библиотеки случайных вариантов.

AmpR- последовательность гена бета-лактамазы обеспечивающая устойчивость *E.coli* к ампициллину,

pUC origin – высококопийный ориджин репликации бактерий,

AAV Rep genes – последовательность, кодирующая белки Rep, необходимые для жизненного цикла вируса,

SwaI - сайт узнавания эндонуклеазой рестрикции SwaI,

NotI - сайт узнавания эндонуклеазой рестрикции NotI.

Фигура 3 представляет собой кольцевую схему плазмиды pHelper, которая предназначена для наработки рекомбинантных вирусных препаратов дикого типа AAV из библиотеки случайных вариантов.

AmpR – ген бета-лактамазы, обеспечивающий устойчивость к ампициллину,

Ori- ориджин репликации в бактериях,

Adeno E2A – последовательность гена хелперного аденовируса, участвующая в репликации вирусной ДНК,

Adeno E4 - последовательность гена хелперного аденовируса, участвующая в репликации вирусной ДНК,

Adeno VARNA - последовательность гена хелперного аденовируса, отвечающая за стимуляцию трансляции как ранних, так и поздних вирусных генов.

Фигура 4 представляет собой кольцевую схему плазмиды pAAV-RC5, которая предназначена для наработки рекомбинантных вирусных препаратов AAV 5 серотипа.

AmpR- последовательность гена бета-лактамазы обеспечивающая устойчивость *E.coli* к ампициллину,

pUC origin – высококопийный ориджин репликации прокариот,

AAV Rep genes – последовательность, кодирующая белки Rep, необходимые для жизненного цикла аденоассоциированного вируса,

AAV5 Cap genes – последовательность, кодирующая перекрывающиеся нуклеотидные последовательности белков капсида аденоассоциированного вируса пятого серотипа: VP1, VP2 и VP3.

Фигура 5 представляет собой кольцевую схему плазмиды pAAV-RC9, которая предназначена для наработки рекомбинантных вирусных препаратов AAV 9 серотипа.

AmpR- последовательность гена бета-лактамазы обеспечивающая устойчивость *E.coli* к ампициллину,

pUC origin – высококопийный ориджин репликации прокариот,

AAV Rep genes – последовательность, кодирующая белки Rep, необходимые для жизненного цикла аденоассоциированного вируса,

AAV9 Cap genes – последовательность, кодирующая перекрывающиеся нуклеотидные последовательности белков капсида аденоассоциированного вируса девятого серотипа: VP1, VP2 и VP3.

Фигура 6 представляет собой график, который показывает эффективность наработки векторов на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5).

Vg/ml кж обозначает количество вирусных геномов на миллилитр культуральной жидкости.

AAV5-NullMut-GFP обозначает вектор на основе rAAV5 с белком VP1 капсида дикого типа.

AAV5-01Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутациями S2A и T711S.

AAV5-02Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутациями S2A, G226A и T711S.

AAV5-03Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутациями S2A, D286E и T711S.

AAV5-04Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутациями S2A, L341Y и T711S.

AAV5-05Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутациями S2A, C387V и T711S.

AAV5-06Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутациями S2A, Q421H и T711S.

AAV5-07Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутациями S2A, P466T и T711S.

AAV5-08Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутациями S2A, S594Q и T711S.

AAV5-09Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутациями S2A, T614L и T711S.

AAV5-10Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутациями S2A, N679K и T711S.

AAV5-11Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутациями S2A, P723V и T711S.

AAV5-12Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутациями S2A, V431Y и T711S.

AAV5-13Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутациями S2A, A616D и T711S.

AAV5-14Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутациями S2A, W683R и T711S.

AAV5-15Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутациями S2A, S222A и T711S.

AAV5-16Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутациями S2A, R285L и T711S.

AAV5-17Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутациями S2A, Q340A и T711S.

AAV5-18Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутациями S2A, S420F и T711S.

AAV5-19Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутациями S2A, S680A и T711S.

AAV5-20Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутациями S2A, T721V и T711S.

Фигура 7 представляет собой график, который показывает эффективность наработки векторов на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5).

Vg/ml кж обозначает количество вирусных геномов на миллилитр культуральной жидкости.

AAV5-NullMut-GFP обозначает вектор на основе rAAV5 с белком VP1 капсида дикого типа.

AAV5-01Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутациями S2A и T711S.

AAV5-21Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутацией G226A.

AAV5-22Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутацией D286E.

AAV5-23Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутацией L341Y.

AAV5-24Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутацией C387V.

AAV5-25Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутацией Q421H.

AAV5-26Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутацией P466T.

AAV5-27Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутацией S594Q.

AAV5-28Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутацией T614L.

AAV5-29Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутацией N679K.

AAV5-30Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутацией P723V.

AAV5-31Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутацией V431Y.

AAV5-32Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутацией A616D.

AAV5-33Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутацией W683R.

AAV5-34Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутацией S222A.

AAV5-35Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутацией R285L.

AAV5-36Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутацией Q340A.

AAV5-37Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутацией S420F.

AAV5-38Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутацией S680A.

AAV5-39Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутацией T721V.

Фигура 8 представляет собой график, который показывает эффективность наработки векторов на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 9 серотипа (rAAV9).

Vg/ml кж обозначает количество вирусных геномов на миллилитр культуральной жидкости.

AAV9-NullMut-GFP обозначает вектор на основе rAAV9 с белком VP1 капсида дикого типа.

AAV9-01Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 9 серотипа (rAAV9), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV9 с мутацией S232T.

AAV9-02Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 9 серотипа (rAAV9), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV9 с мутацией D297E.

AAV9-03Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 9 серотипа (rAAV9), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV9 с мутацией Q351K.

AAV9-04Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 9 серотипа (rAAV9), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV9 с мутацией Q351R.

AAV9-05Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 9 серотипа (rAAV9), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV9 с мутацией C396V.

AAV9-06Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 9 серотипа (rAAV9), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV9 с мутацией D433Y.

AAV9-07Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 9 серотипа (rAAV9), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV9 с мутацией L444R.

AAV9-08Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 9 серотипа (rAAV9), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV9 с мутацией Y478F.

AAV9-09Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 9 серотипа (rAAV9), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV9 с мутацией G604N.

AAV9-10Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 9 серотипа (rAAV9), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV9 с мутацией G627K.

AAV9-11Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 9 серотипа (rAAV9), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV9 с мутацией T625L.

AAV9-12Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 9 серотипа (rAAV9), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV9 с мутацией T625V.

AAV9-13Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 9 серотипа (rAAV9), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV9 с мутацией S692T.

AAV9-14Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 9 серотипа (гAAV9), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV9 с мутацией T733V.

AAV9-15Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 9 серотипа (гAAV9), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV9 с мутацией A427R.

AAV9-16Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 9 серотипа (гAAV9), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV9 с мутацией M635D.

AAV9-17Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 9 серотипа (гAAV9), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV9 с мутацией W695R.

AAV9-18Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 9 серотипа (гAAV9), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV9 с мутацией R296L.

AAV9-19Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 9 серотипа (гAAV9), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV9 с мутацией Q351A.

AAV9-20Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 9 серотипа (гAAV9), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV9 с мутацией Y395F.

AAV9-21Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 9 серотипа (гAAV9), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV9 с мутацией R434L.

AAV9-22Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 9 серотипа (гAAV9), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV9 с мутацией N691A.

Фигура 9 представляет собой график, который показывает эффективность трансдукции клеток препаратами на основе гAAV5, содержащими точечные мутации в белке VP1 капсида гAAV5 дикого типа или в белке VP1 капсида гAAV5, который уже содержит мутации S2A и T711S.

AAV5-NullMut-GFP обозначает вектор на основе гAAV5 с белком VP1 капсида дикого типа

AAV5-01Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутациями S2A и T711S.

AAV5-02Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутациями S2A, G226A и T711S.

AAV5-03Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутациями S2A, D286E и T711S.

AAV5-04Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутациями S2A, L341Y и T711S.

AAV5-05Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутациями S2A, C387V и T711S.

AAV5-06Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутациями S2A, Q421H и T711S.

AAV5-07Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутациями S2A, P466T и T711S.

AAV5-08Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутациями S2A, S594Q и T711S.

AAV5-09Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутациями S2A, T614L и T711S.

AAV5-10Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутациями S2A, N679K и T711S.

AAV5-11Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутациями S2A, P723V и T711S.

AAV5-12Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутациями S2A, V431Y и T711S.

AAV5-13Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутациями S2A, A616D и T711S.

AAV5-14Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутациями S2A, W683R и T711S.

AAV5-15Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутациями S2A, S222A и T711S.

AAV5-16Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутациями S2A, R285L и T711S.

AAV5-17Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутациями S2A, Q340A и T711S.

AAV5-18Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутациями S2A, S420F и T711S.

AAV5-19Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутациями S2A, S680A и T711S.

AAV5-20Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутациями S2A, T721V и T711S.

Фигура 10 представляет собой график, который показывает эффективность трансдукции клеток препаратами на основе rAAV5, содержащими точечные мутации в белке VP1 капсида rAAV5 дикого типа

AAV5-NullMut-GFP обозначает вектор на основе rAAV5 с белком VP1 капсида дикого типа.

AAV5-01Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутациями S2A и T711S.

AAV5-21Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутацией G226A.

AAV5-22Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутацией D286E.

AAV5-23Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутацией L341Y.

AAV5-24Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутацией C387V.

AAV5-25Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутацией Q421H.

AAV5-26Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутацией P466T.

AAV5-27Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутацией S594Q.

AAV5-28Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутацией T614L.

AAV5-29Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутацией N679K.

AAV5-30Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутацией P723V.

AAV5-31Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутацией V431Y.

AAV5-32Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутацией A616D.

AAV5-33Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутацией W683R.

AAV5-34Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутацией S222A.

AAV5-35Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутацией R285L.

AAV5-36Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутацией Q340A.

AAV5-37Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутацией S420F.

AAV5-38Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутацией S680A.

AAV5-39Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутацией T721V.

Фигура 11 представляет собой график, который показывает эффективность трансдукции клеток препаратами на основе rAAV9, содержащими точечные мутации в белке VP1 капсида rAAV9 дикого типа.

AAV9-NullMut-GFP обозначает вектор на основе rAAV9 с белком VP1 капсида дикого типа.

AAV9-01Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 9 серотипа (rAAV9), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV9 с мутацией S232T.

AAV9-02Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 9 серотипа (rAAV9), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV9 с мутацией D297E.

AAV9-03Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 9 серотипа (rAAV9), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV9 с мутацией Q351K.

AAV9-04Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 9 серотипа (rAAV9), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV9 с мутацией Q351R.

AAV9-05Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 9 серотипа (rAAV9), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV9 с мутацией C396V.

AAV9-06Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 9 серотипа (rAAV9), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV9 с мутацией D433Y.

AAV9-07Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 9 серотипа (rAAV9), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV9 с мутацией L444R.

AAV9-08Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 9 серотипа (rAAV9), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV9 с мутацией Y478F.

AAV9-09Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 9 серотипа (rAAV9), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV9 с мутацией G604N.

AAV9-10Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 9 серотипа (rAAV9), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV9 с мутацией G627K.

AAV9-11Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 9 серотипа (rAAV9), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV9 с мутацией T625L.

AAV9-12Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 9 серотипа (rAAV9), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV9 с мутацией T625V.

AAV9-13Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 9 серотипа (rAAV9), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV9 с мутацией S692T.

AAV9-14Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 9 серотипа (гAAV9), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV9 с мутацией T733V.

AAV9-15Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 9 серотипа (гAAV9), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV9 с мутацией A427R.

AAV9-16Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 9 серотипа (гAAV9), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV9 с мутацией M635D.

AAV9-17Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 9 серотипа (гAAV9), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV9 с мутацией W695R.

AAV9-18Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 9 серотипа (гAAV9), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV9 с мутацией R296L.

AAV9-19Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 9 серотипа (гAAV9), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV9 с мутацией Q351A.

AAV9-20Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 9 серотипа (гAAV9), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV9 с мутацией Y395F.

AAV9-21Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 9 серотипа (гAAV9), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV9 с мутацией R434L.

AAV9-22Mut-GFP обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 9 серотипа (гAAV9), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV9 с мутацией N691A.

Фигура 12 представляет собой график, который показывает эффективность продукции целевого белка, кодируемого трансгеном, после трансдукции клеток препаратами на основе гAAV5, содержащими единичные мутации в белке VP1 капсида гAAV5 дикого типа или в белке VP1 капсида гAAV5, который уже содержит мутации S2A и T711S.

AAV5-NullMut-FIX обозначает вектор на основе гAAV5 с белком VP1 капсида дикого типа.

AAV5-01Mut-FIX обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутациями S2A и T711S.

AAV5-02Mut-FIX обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутациями S2A, G226A и T711S.

AAV5-03Mut-FIX обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутациями S2A, D286E и T711S.

AAV5-04Mut-FIX обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутациями S2A, L341Y и T711S.

AAV5-05Mut-FIX обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутациями S2A, C387V и T711S.

AAV5-06Mut-FIX обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутациями S2A, Q421H и T711S.

AAV5-07Mut-FIX обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутациями S2A, P466T и T711S.

AAV5-08Mut-FIX обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутациями S2A, S594Q и T711S.

AAV5-09Mut-FIX обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутациями S2A, T614L и T711S.

AAV5-10Mut-FIX обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутациями S2A, N679K и T711S.

AAV5-11Mut-FIX обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутациями S2A, P723V и T711S.

AAV5-12Mut-FIX обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутациями S2A, V431Y и T711S.

AAV5-13Mut-FIX обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутациями S2A, A616D и T711S.

AAV5-14Mut-FIX обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутациями S2A, W683R и T711S.

AAV5-15Mut-FIX обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутациями S2A, S222A и T711S.

AAV5-16Mut-FIX обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутациями S2A, R285L и T711S.

AAV5-17Mut-FIX обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутациями S2A, Q340A и T711S.

AAV5-18Mut-FIX обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутациями S2A, S420F и T711S.

AAV5-19Mut-FIX обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутациями S2A, S680A и T711S.

AAV5-20Mut-FIX обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутациями S2A, T721V и T711S.

Фигура 13 представляет собой график, который показывает эффективность продукции целевого белка, кодируемого трансгеном, после трансдукции клеток препаратами на основе rAAV5, содержащими единичные мутации в белке VP1 капсида rAAV5 дикого типа.

AAV5-NullMut-FIX обозначает вектор на основе rAAV5 с белком VP1 капсида дикого типа.

AAV5-01Mut-FIX обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутациями S2A и T711S.

AAV5-21Mut-FIX обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутацией G226A.

AAV5-22Mut-FIX обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутацией D286E.

AAV5-23Mut-FIX обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутацией L341Y.

AAV5-24Mut-FIX обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутацией C387V.

AAV5-25Mut-FIX обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутацией Q421H.

AAV5-26Mut-FIX обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутацией P466T.

AAV5-27Mut-FIX обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутацией S594Q.

AAV5-28Mut-FIX обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутацией T614L.

AAV5-29Mut-FIX обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутацией N679K.

AAV5-30Mut-FIX обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутацией P723V.

AAV5-31Mut-FIX обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (гAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутацией V431Y.

AAV5-32Mut-FIX обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (гAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутацией A616D.

AAV5-33Mut-FIX обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (гAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутацией W683R.

AAV5-34Mut-FIX обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (гAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутацией S222A.

AAV5-35Mut-FIX обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (гAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутацией R285L.

AAV5-36Mut-FIX обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (гAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутацией Q340A.

AAV5-37Mut-FIX обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (гAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутацией S420F.

AAV5-38Mut-FIX обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (гAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутацией S680A.

AAV5-39Mut-FIX обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (гAAV5), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV5 с мутацией T721V.

Фигура 14 представляет собой график, который показывает эффективность продукции целевого белка, кодируемого трансгеном, после трансдукции клеток препаратами на основе гAAV9, содержащими мутации в белке VP1 капсида гAAV9 дикого типа

AAV9-NullMut-FIX обозначает вектор на основе гAAV9 с белком VP1 капсида дикого типа

AAV9-01Mut-FIX обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 9 серотипа (rAAV9), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV9 с мутацией S232T.

AAV9-02Mut-FIX обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 9 серотипа (rAAV9), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV9 с мутацией D297E.

AAV9-03Mut-FIX обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 9 серотипа (rAAV9), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV9 с мутацией Q351K.

AAV9-04Mut-FIX обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 9 серотипа (rAAV9), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV9 с мутацией Q351R.

AAV9-05Mut-FIX обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 9 серотипа (rAAV9), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV9 с мутацией C396V.

AAV9-06Mut-FIX обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 9 серотипа (rAAV9), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV9 с мутацией D433Y.

AAV9-07Mut-FIX обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 9 серотипа (rAAV9), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV9 с мутацией L444R.

AAV9-08Mut-FIX обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 9 серотипа (rAAV9), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV9 с мутацией Y478F.

AAV9-09Mut-FIX обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 9 серотипа (rAAV9), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV9 с мутацией G604N.

AAV9-10Mut-FIX обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 9 серотипа (rAAV9), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV9 с мутацией G627K.

AAV9-11Mut-FIX обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 9 серотипа (rAAV9), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV9 с мутацией T625L.

AAV9-12Mut-FIX обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 9 серотипа (гAAV9), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV9 с мутацией T625V.

AAV9-13Mut-FIX обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 9 серотипа (гAAV9), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV9 с мутацией S692T

AAV9-14Mut-FIX обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 9 серотипа (гAAV9), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV9 с мутацией T733V.

AAV9-15Mut-FIX обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 9 серотипа (гAAV9), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV9 с мутацией A427R.

AAV9-16Mut-FIX обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 9 серотипа (гAAV9), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV9 с мутацией M635D.

AAV9-17Mut-FIX обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 9 серотипа (гAAV9), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV9 с мутацией W695R.

AAV9-18Mut-FIX обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 9 серотипа (гAAV9), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV9 с мутацией R296L.

AAV9-19Mut-FIX обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 9 серотипа (гAAV9), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV9 с мутацией Q351A.

AAV9-20Mut-FIX обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 9 серотипа (гAAV9), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV9 с мутацией Y395F.

AAV9-21Mut-FIX обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 9 серотипа (гAAV9), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV9 с мутацией R434L.

AAV9-22Mut-FIX обозначает вектор на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 9 серотипа (гAAV9), включающего модифицированный белок VP1 капсида AAV9 с мутацией N691A.

Определения и общие методы

Если иное не определено в настоящем документе, научные и технические термины, используемые в связи с настоящим изобретением, будут иметь значения, которые обычно понятны специалистам в данной области.

Кроме того, если по контексту не требуется иное, термины в единственном числе включают в себя термины во множественном числе, и термины во множественном числе включают в себя термины в единственном числе. Как правило, используемая классификация и методы культивирования клеток, молекулярной биологии, иммунологии, микробиологии, генетики, аналитической химии, химии органического синтеза, медицинской и фармацевтической химии, а также гибридизации и химии белка и нуклеиновых кислот, описанные в настоящем документе, хорошо известны специалистам и широко применяются в данной области. Ферментативные реакции и способы очистки осуществляют в соответствии с инструкциями производителя, как это обычно осуществляется в данной области, или как описано в настоящем документе.

Определения «встречающийся в природе», «нативный» или «дикого типа» используют для описания объекта, который можно обнаружить в природе как отличающийся от получаемого искусственно. Например, белок или нуклеотидная последовательность, присутствующие в организме (включая вирус), которые можно изолировать из источника в природе, и которые не модифицированы умышленно специалистом в лаборатории, являются встречающимися в природе.

В настоящем описании и в последующей формуле изобретения, если контекстом не предусмотрено иное, слова «включать» и «содержать» или их вариации, такие как «включает», «включающий», «содержит» или «содержащий», следует понимать как включение указанного целого или группы целых, но не исключение любого другого целого или группы целых.

Аденоассоциированный вирус (AAV)

Вирусы семейства Parvoviridae представляют собой небольшие ДНК-содержащие вирусы животных. Семейство Parvoviridae может быть разделено на два подсемейства: Parvovirinae, представители которого инфицируют позвоночных животных, и Densovirinae, представители которого инфицируют насекомых. К 2006 году были описаны 11 серотипов аденоассоциированного вируса (Mori, S. ET AL., 2004, «Two novel adeno-associated viruses from cynomolgus monkey: pseudotyping characterization of capsid protein», Virology, T. 330 (2): 375-83). В 2008 году был описан 12 серотип аденоассоциированного вируса (Michael Schmidt ET AL., Adeno-associated virus type 12 (AAV12): a novel AAV serotype with sialic acid- and heparan sulfate proteoglycan-independent transduction activity, J Virol. 2008 Feb;82(3):1399-406. doi: 10.1128/JVI.02012-07). Все известные серотипы могут

инфицировать клетки многих видов тканей. Тканевая специфичность определяется серотипом белков капсида, поэтому векторы на основе аденоассоциированного вируса конструируют, задавая необходимый серотип. Дополнительная информация по парвовирусам и другим представителям Parvoviridae описана в литературе (Kenneth I. Berns, «Parvoviridae: The Viruses and Their Replication», Chapter 69 in Fields Virology (3d Ed. 1996)).

Геномная организация всех известных серотипов AAV очень сходна. Геном AAV представляет собой линейную одноцепочечную молекулу ДНК, которая содержит менее чем примерно 5000 нуклеотидов (нт) в длину. Инвертированные концевые повторы (ITR) фланкируют уникальные кодирующие нуклеотидные последовательности белков (Rep), необходимых для обеспечения жизненного цикла вируса, а также последовательности перекрывающихся белков капсида (Cap). Ген Cap кодирует белки VP (VP1, VP2 и VP3), которые образуют капсид, а также белки AAP (белок, активирующий сборку аденоассоциированного вируса (AAV) Sonntag F, Köther K, Schmidt K, et al. The assembly-activating protein promotes capsid assembly of different adeno-associated virus serotypes. J Virol. 2011;85(23):12686-12697. doi:10.1128/JVI.05359-11) и MAAP (вспомогательный белок связывания с мембраной Ogden PJ, Kelsic ED, Sinai S, Church GM. Comprehensive AAV capsid fitness landscape reveals a viral gene and enables machine-guided design. Science. 2019;366(6469):1139-1143. doi:10.1126/science.aaw2900). Фланкирующие последовательности генома AAV длиной в 145 нуклеотидов являются самокомплементарными и организованы таким образом, что может быть сформирован энергетически стабильный внутримолекулярный дуплекс, образующий Т-образную шпильчатую структуру. Такие шпильчатые структуры функционируют как точки начала репликации ДНК вируса, являясь праймерами для клеточного ДНК-полимеразного комплекса. После инфекции клеток млекопитающих AAV дикого типа (wtAAV) гены Rep (например, Rep78 и Rep52) экспрессируются с помощью P5 промотора и P19 промотора, соответственно, и оба белка Rep выполняют определенную функцию в репликации генома вируса. Сплайсинг в открытой рамке считывания Rep (Rep ORF) приводит к экспрессии фактически четырех белков Rep (например, Rep78, Rep68, Rep52 и Rep40). Однако было показано, что несплайсированная мРНК, кодирующая белки Rep78 и Rep52, является достаточной для продукции вектора AAV в клетках млекопитающих.

Вектор на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV)

Термин «вектор» при использовании в настоящем документе означает молекулу нуклеиновой кислоты, способную транспортировать другую нуклеиновую кислоту, с которой она соединена. Кроме того, термин «вектор» в данном настоящем документе означает вирусную частицу, способную транспортировать нуклеиновую кислоту.

Как применяют в настоящем описании, термин «экспрессия» определяют как транскрипцию и/или трансляцию конкретной нуклеотидной последовательности, запускаемую ее промотором.

Применение

«Доставка субъекту гетерологичной последовательности нуклеиновой кислоты» представляет собой вставку генов в клетки и/или ткани субъекта.

Термин «субъект», «пациент», «индивидуум» и т.п. используют в настоящем описании взаимозаменяемо, и они относятся к любому животному, которое поддается воздействию способами, представленными в настоящем описании. В конкретных неограничивающих вариантах осуществления субъект, пациент или индивидуум является человеком. Вышеупомянутый субъект может быть мужского или женского пола любого возраста.

Подробное описание изобретения

Способ получения модифицированного капсида аденоассоциированного вируса

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу получения модифицированного капсида AAV, который включает:

а) определение аминокислот белка-капсомера модифицируемого AAV, расположенных в области интерфейса взаимодействия соседних пентамерных субъединиц капсида;

б) структурное выравнивание модифицируемого капсида AAV с капсидом-шаблоном для определения попарного соответствия между каждой аминокислотой модифицируемого AAV из области интерфейса взаимодействия между соседними пентамерными субъединицами и ближайшей к ней аминокислотой капсида-шаблона, как структурного аналога исходной аминокислоты, которая рассматривается в качестве потенциальной замены,

где под капсидом-шаблоном понимают схожий по строению капсид вируса, выбранного из семейства парвовирусов (Parvoviridae), который не является AAV;

в) попарное сравнение определенных на стадии б) остатков аминокислот капсида AAV и капсида-шаблона для выявления структурных различий капсида модифицируемого AAV и капсида-шаблона в области интерфейса взаимодействия соседних пентамерных субъединиц капсида;

г) выбор позиций для мутагенеза, при этом аминокислотные остатки для мутагенеза находятся в области интерфейса взаимодействия соседних пентамерных субъединиц капсида модифицируемого AAV и имеют структурное различие между капсидом

модифицируемого AAV и капсидом-шаблоном в области интерфейса взаимодействия соседних пентамерных субъединиц капсида;

д) выбор аминокислотного остатка для мутагенеза в позиции, выбранной на стадии г), с использованием одного из следующих принципов:

-замена исходной аминокислоты в белке-капсомере модифицируемого AAV на аминокислоту, которая имеет больший объем, за исключением цистеина и метионина;

-замена исходной аминокислоты в белке-капсомере модифицируемого AAV на аминокислоту, которая имеет увеличенное или уменьшенное число полярных контактов между капсомерами, за исключением цистеина и метионина;

е) введение одной или нескольких аминокислотных замен, выбранных на стадиях г)-д), в области интерфейса взаимодействия соседних пентамерных субъединиц капсида модифицируемого AAV.

Под интерфейсом (или поверхностью) взаимодействия понимается набор фрагментов полипептидной цепи белка-капсомера, взаимодействующих с аминокислотами соседней пентамерной субъединицы, где под пентамерной субъединицей понимается структурный элемент капсида в форме правильного пятиугольника, состоящий из 5 белков-капсомеров, расположенных вокруг центральной поры (L. M. Drouin and M. Agbandje-McKenna. Adeno-associated virus structural biology as a tool in vector development. Future Virol., vol. 8, no. 12, pp. 1183–1199, 2013).

Под интерфейсом взаимодействия для данной субъединицы мы понимаем все аминокислоты, хотя бы один атом которых находится на расстоянии, не превышающем 5 Å от какого-либо атома из соседних пентамерных субъединиц.

Для AAV5 мы производили расчет по структуре капсида PDB ID: 6JCT.

В ней, согласно расчету, к интерфейсу взаимодействия между соседними пентамерными субъединицами AAV5 относятся следующие диапазоны остатков белка VP1 капсида AAV5: 220 – 226, 283 – 293, 339 – 342, 385 – 392, 412 – 435, 462 – 466, 590 – 598, 611 – 626, 677 – 685, 721-724.

Для AAV9 аналогичный расчет был сделан по структуре PDB ID: 3UX1.

В ней, согласно расчету, к интерфейсу взаимодействия между соседними пентамерными субъединицами AAV9 относятся следующие диапазоны остатков белка VP1 капсида AAV9: 230 – 236, 294 – 304, 350 – 353, 394 – 401, 421 – 444, 476 – 480, 601 – 609, 622 – 637, 689 – 697, 733 – 736.

Под «одной или несколькими аминокислотными заменами» подразумеваются одна, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять аминокислотных замен. Например, от 1 до 10 аминокислотных замен, от 1 до 9 аминокислотных замен, от 1 до 8

аминокислотных замен, от 1 до 7 аминокислотных замен, от 1 до 6 аминокислотных замен, от 1 до 5 аминокислотных замен, от 1 до 4 аминокислотных замен, от 1 до 3 аминокислотных замен или от 1 до 2 аминокислотных замен.

В некоторых вариантах осуществления изобретения способ получения модифицированного капсида AAV дополнительно включает проверку полученных на стадии е) модифицированных капсидов AAV с одной или несколькими аминокислотными заменами на наличие одного или нескольких улучшенных свойств по сравнению с капсидом AAV без данных модификаций, где одно или несколько улучшенных свойств выбирают из группы:

- увеличение эффективности трансдукции клеток,
- увеличение продукции целевого белка,
- увеличение эффективности наработки за счет высокоэффективной продукции (сборки) инкапсидированных вирусных векторов на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV).

В некоторых вариантах осуществления изобретения способ получения модифицированного капсида AAV дополнительно включает проверку полученных на стадии е) модифицированных капсидов AAV на наличие одного или нескольких улучшенных свойств по сравнению с капсидом AAV без данных модификаций и отбор модифицированных капсидов AAV, которые имеют одно или несколько улучшенных свойств по сравнению с капсидом AAV без данных модификаций, где одно или несколько улучшенных свойств выбирают из группы:

- увеличение эффективности трансдукции клеток,
- увеличение продукции целевого белка,
- увеличение эффективности наработки за счет высокоэффективной продукции (сборки) инкапсидированных вирусных векторов на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV).

В некоторых вариантах осуществления способа получения капсида AAV капсид модифицируемого AAV выбирают из группы, включающей: AAV человека, AAV обезьян или AAV птиц.

В некоторых вариантах осуществления способа получения капсида AAV капсид модифицируемого AAV выбирают из группы, включающей следующие серотипы AAV: AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV13, AAV14, AAV15, AAV16, rAAV.rh8, rAAV.rh10, rAAV.rh20, rAAV.rh39, rAAV.Rh74, rAAV.RHM4-l, AAV.hu37, rAAV.Anc80, rAAV.Anc80L65, rAAV.7m8, rAAV.PHP.B, rAAV2.5, rAAV2tYF, rAAV3B, rAAV.LK03, AAV.HSC1, AAV.HSC2,

AAV.HSC3, AAV.HSC4, AAV.HSC5, AAV.HSC6, AAV.HSC7, AAV.HSC8, AAV.HSC9, AAV.HSC10, AAV.HSC11, AAV.HSC12, AAV.HSC13, AAV.HSC14, AAV.HSC15 или AAV.HSC16.

В некоторых вариантах осуществления способа получения капсида AAV капсид модифицируемого AAV может представлять капсид AAV дикого типа или капсид AAV, который включает одну или несколько аминокислотных замен в белках VP1, VP2 и/или VP3.

В некоторых вариантах осуществления способа получения капсида AAV капсид модифицируемого AAV может представлять капсид AAV5 дикого типа или капсид AAV5, который включает одну или несколько аминокислотных замен в белках VP1, VP2 и/или VP3.

В некоторых вариантах осуществления способа получения капсида AAV капсид модифицируемого AAV может представлять капсид AAV5, который включает аминокислотные замены S2A и T711S в белке VP1.

В некоторых вариантах осуществления способа получения капсида AAV капсид модифицируемого AAV может представлять капсид AAV9 дикого типа или капсид AAV9, который включает одну или несколько аминокислотных замен в белках VP1, VP2 и/или VP3.

В некоторых вариантах осуществления способа получения капсида AAV схожий по строению капсид-шаблон, выбирают из группы, которая включает: парвовирус B19, человеческий бокавирус 1 (HBoV1), парвовирус крупного рогатого скота (BVP).

Модифицированный капсид AAV по изобретению

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к модифицированному капсиду AAV для получения вирусных векторов на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса, который получен способом, включающим:

а) определение аминокислот белка-капсомера модифицируемого AAV, расположенных в области интерфейса взаимодействия соседних пентамерных субъединиц капсида;

б) структурное выравнивание модифицируемого капсида AAV с капсидом-шаблоном для определения попарного соответствия между каждой аминокислотой модифицируемого AAV из области интерфейса взаимодействия между соседними пентамерными субъединицами и ближайшей к ней аминокислотой капсида-шаблона, как структурного аналога исходной аминокислоты, которая рассматривается в качестве потенциальной замены,

где под капсидом-шаблоном понимают схожий по строению капсид вируса, выбранного из семейства парвовирусов (Parvoviridae), который не является AAV;

в) попарное сравнение определенных на стадии б) остатков аминокислот капсида AAV и капсида-шаблона для выявления структурных различий капсида модифицируемого AAV и капсида-шаблона в области интерфейса взаимодействия соседних пентамерных субъединиц капсида;

г) выбор позиций для мутагенеза, при этом аминокислотные остатки для мутагенеза находятся в области интерфейса взаимодействия соседних пентамерных субъединиц капсида модифицируемого AAV и имеют структурное различие между капсидом модифицируемого AAV и капсидом-шаблоном в области интерфейса взаимодействия соседних пентамерных субъединиц капсида;

д) выбор аминокислотного остатка для мутагенеза в позиции, выбранной на стадии г), с использованием одного из следующих принципов:

-замена исходной аминокислоты в белке-капсомере модифицируемого AAV на аминокислоту, которая имеет больший объем, за исключением цистеина и метионина;

-замена исходной аминокислоты в белке-капсомере модифицируемого AAV на аминокислоту, которая имеет увеличенное или уменьшенное число полярных контактов между капсомерами, за исключением цистеина и метионина;

е) введение одной или нескольких аминокислотных замен, выбранных на стадиях г)-д), в области интерфейса взаимодействия соседних пентамерных субъединиц капсида модифицируемого AAV;

а также, при необходимости, дополнительно включает

ж) проверку полученных на стадии е) модифицированных капсидов AAV на наличие одного или нескольких улучшенных свойств по сравнению с капсидом AAV без данных модификаций и отбор модифицированных капсидов AAV, которые имеют одно или несколько улучшенных свойств по сравнению с капсидом AAV без данных модификаций, где одно или несколько улучшенных свойств выбирают из группы:

-увеличение эффективности трансдукции клеток,

-увеличение продукции целевого белка,

-увеличение эффективности наработки за счет высокоэффективной продукции (сборки) инкапсидированных вирусных векторов на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV).

В некоторых вариантах осуществления модифицированного капсида AAV капсид модифицируемого AAV выбирают из группы, включающей: AAV человека, AAV обезьян или AAV птиц.

В некоторых вариантах осуществления модифицированного капсида AAV капсид модифицируемого AAV выбирают из группы, включающей следующие серотипы AAV: AAV: AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10 AAV11, AAV12, AAV13, AAV14, AAV15, AAV16, rAAV.rh8, rAAV.rh10, rAAV.rh20, rAAV.rh39, rAAV.Rh74, rAAV.RHM4-l, AAV.hu37, rAAV.Anc80, rAAV.Anc80L65, rAAV.7m8, rAAV.PHP.B, rAAV2.5, rAAV2tYF, rAAV3B, rAAV.LK03, AAV.HSC1, AAV.HSC2, AAV.HSC3, AAV.HSC4, AAV.HSC5, AAV.HSC6, AAV.HSC7, AAV.HSC8, AAV.HSC9, AAV.HSC10, AAV.HSC11, AAV.HSC12, AAV.HSC13, AAV.HSC14, AAV.HSC15 или AAV.HSC16.

В некоторых вариантах осуществления модифицированного капсида AAV капсид модифицируемого AAV может представлять капсид AAV дикого типа или капсид AAV, который включает одну или несколько аминокислотных замен в белках VP1, VP2 и/или VP3.

В некоторых вариантах осуществления модифицированного капсида AAV капсид модифицируемого AAV может представлять капсид AAV5 дикого типа или капсид AAV5, который включает одну или несколько аминокислотных замен в белках VP1, VP2 и/или VP3.

В некоторых вариантах осуществления модифицированного капсида AAV капсид модифицируемого AAV может представлять капсид AAV5, который включает аминокислотные замены S2A и T711S в белке VP1.

В некоторых вариантах осуществления модифицированного капсида AAV капсид модифицируемого AAV может представлять капсид AAV9 дикого типа или капсид AAV9, который включает одну или несколько аминокислотных замен в белках VP1, VP2 и/или VP3.

«Правая часть» (+)-цепи геномной ДНК аденоассоциированного вируса содержит перекрывающиеся последовательности, кодирующие три белка капсида — VP1, VP2 и VP3. Транскрипция этих генов начинается с одного промотора, p40. Молекулярная масса соответствующих белков составляет 87, 72 и 62 кДа, соответственно. Все три белка транслируются с одной мРНК. После транскрипции пре-мРНК может подвергаться сплайсингу двумя разными способами, при этом вырезается более длинный или более короткий интрон и образуются мРНК длиной 2300 или 2600 нуклеотидов.

Таким образом, введение мутаций в ген *Cap* будет влиять не только на белок VP1 капсида AAV, но и на белки VP2 и VP3 капсида AAV.

Ниже приведены положения структурных белков капсида AAV5 в последовательности гена *Cap* AAV5:

1-725 ак – VP1,
137-725 ак – VP2,
193-725 ак – VP3.

Ниже приведены положения структурных белков капсида AAV9 в последовательности гена Cap AAV9:

1-737 ак - VP1,
138-737 ак – VP2,
203-737 ак – VP3.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP1 капсида AAV, который имеет аминокислотную последовательность, которую выбирают из группы: SEQ ID No: 14, 20, 26, 32, 38, 44, 50, 56, 62, 68, 74, 80, 86, 92, 98, 104, 110, 116, 122, 128, 134, 140, 146, 152, 158, 164, 170, 176, 182, 188, 194, 200, 206, 212, 218, 224, 230, 236, 242, 248, 254, 260, 266, 272, 278, 284, 290, 296, 302, 308, 314, 320, 326, 332, 338, 344, 350, 356, 362 или 368.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP2 капсида AAV, который имеет аминокислотную последовательность, которую выбирают из группы: SEQ ID No: 16, 22, 28, 34, 40, 46, 52, 58, 64, 70, 76, 82, 88, 94, 100, 106, 112, 118, 124, 130, 136, 142, 148, 154, 160, 166, 172, 178, 184, 190, 196, 202, 208, 214, 220, 226, 232, 238, 244, 250, 256, 262, 268, 274, 280, 286, 292, 298, 304, 310, 316, 322, 328, 334, 340, 346, 352, 358, 364 или 370.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP3 капсида AAV, который имеет аминокислотную последовательность, которую выбирают из группы: SEQ ID No: 18, 24, 30, 36, 42, 48, 54, 60, 66, 72, 78, 84, 90, 96, 102, 108, 114, 120, 126, 132, 138, 144, 150, 156, 162, 168, 174, 180, 186, 192, 198, 204, 210, 216, 222, 228, 234, 240, 246, 252, 258, 264, 270, 276, 282, 288, 294, 300, 306, 312, 318, 324, 330, 336, 342, 348, 354, 360, 366 или 372.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает:

а) модифицированный белок VP1 капсида AAV, который имеет аминокислотную последовательность, которую выбирают из группы: SEQ ID No: 14, 20, 26, 32, 38, 44, 50, 56, 62, 68, 74, 80, 86, 92, 98, 104, 110, 116, 122, 128, 134, 140, 146, 152, 158, 164, 170, 176, 182, 188, 194, 200, 206, 212, 218, 224, 230, 236, 242, 248, 254, 260, 266, 272, 278, 284, 290, 296, 302, 308, 314, 320, 326, 332, 338, 344, 350, 356, 362 или 368;

б) соответствующий своему белку VP1 модифицированный белок VP2 капсида AAV, который имеет аминокислотную последовательность, которую выбирают из группы:

SEQ ID No: 16, 22, 28, 34, 40, 46, 52, 58, 64, 70, 76, 82, 88, 94, 100, 106, 112, 118, 124, 130, 136, 142, 148, 154, 160, 166, 172, 178, 184, 190, 196, 202, 208, 214, 220, 226, 232, 238, 244, 250, 256, 262, 268, 274, 280, 286, 292, 298, 304, 310, 316, 322, 328, 334, 340, 346, 352, 358, 364 или 370;

в) соответствующий своему белку VP1 модифицированный белок VP3 капсида AAV, который имеет аминокислотную последовательность, которую выбирают из группы: SEQ ID No: 18, 24, 30, 36, 42, 48, 54, 60, 66, 72, 78, 84, 90, 96, 102, 108, 114, 120, 126, 132, 138, 144, 150, 156, 162, 168, 174, 180, 186, 192, 198, 204, 210, 216, 222, 228, 234, 240, 246, 252, 258, 264, 270, 276, 282, 288, 294, 300, 306, 312, 318, 324, 330, 336, 342, 348, 354, 360, 366 или 372.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP1 капсида AAV5, который включает замену G226A (AAV5 Capsid VP1 G226A) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 14.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который включает замену G90A (AAV5 Capsid VP2 G90A) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 16.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который включает замену G34A (AAV5 Capsid VP3 G34A) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 18

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP1 капсида AAV5, который включает замены S2A, G226A и T711S (AAV5 Capsid VP1 S2A, G226A и T711S) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 20.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который включает замены G90A и T575S (AAV5 Capsid VP2 G90A и T575S) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 22.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который включает замены G34A T519S (AAV5 Capsid VP3 G34A T519S) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 24.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP1 капсида AAV5, который включает замену D286E (AAV5 Capsid VP1 D286E) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 26.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который включает замену D150E (AAV5 Capsid VP2 D150E) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 28.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который включает замену D94E (AAV5 Capsid VP3 D94E) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 30.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP1 капсида AAV5, который включает замены S2A, D286E и T711S (AAV5 Capsid VP1 S2A, D286E и T711S) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 32.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который включает замены D150E и T575S (AAV5 Capsid VP2 D150E и T575S) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 34.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который включает замены D94E и T519S (AAV5 Capsid VP3 D94E и T519S) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 36.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP1 капсида AAV5, который включает замену L341Y (AAV5 Capsid VP1 L341Y) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 38.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который включает замену L205Y (AAV5 Capsid VP2 L205Y) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 40.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который включает замену

L149Y (AAV5 Capsid VP3 L149Y) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 42.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP1 капсида AAV5, который включает замены S2A, L341Y, T711S (AAV5 Capsid VP1 S2A, L341Y, T711S) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 44.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который включает замены L205Y, T575S (AAV5 Capsid VP2 L205Y, T575S) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 46.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который включает замены L149Y, T519S (AAV5 Capsid VP3 L149Y, T519S) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 48.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP1 капсида AAV5, который включает замену C387V (AAV5 Capsid VP1 C387V) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 50.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который включает замену C251V (AAV5 Capsid VP2 C251V) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 52.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который включает замену C195V (AAV5 Capsid VP3 C195V) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 54.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP1 капсида AAV5, который включает замены S2A, C387V, T711S (AAV5 Capsid VP1 S2A, C387V, T711S) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 56.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который включает замены C251V, T575S (AAV5 Capsid VP2 C251V, T575S) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 58.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который включает замены C195V, T519S (AAV5 Capsid VP3 C195V, T519S) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 60.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP1 капсида AAV5, который включает замену Q421H (AAV5 Capsid VP1 Q421H) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 62.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который включает замену Q285H (AAV5 Capsid VP2 Q285H) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 64.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который включает замену Q229H (AAV5 Capsid VP3 Q229H) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 66.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP1 капсида AAV5, который включает замены S2A Q421H T711S (AAV5 Capsid VP1 S2A Q421H T711S) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 68.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который включает замены Q285H T575S (AAV5 Capsid VP2 Q285H T575S) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 70.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который включает замены Q229H T519S (AAV5 Capsid VP3 Q229H T519S) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 72.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP1 капсида AAV5, который включает замену P466T (AAV5 Capsid VP1 P466T) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 74.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который включает замену

P330T (AAV5 Capsid VP2 P330T) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 76.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который включает замену P274T (AAV5 Capsid VP3 P274T) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 78.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP1 капсида AAV5, который включает замены S2A P466T T711S (AAV5 Capsid VP1 S2A P466T T711S) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 80.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который включает замены P330T T575S (AAV5 Capsid VP2 P330T T575S) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 82.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который включает замены P274T T519S (AAV5 Capsid VP3 P274T T519S) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 84.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP1 капсида AAV5, который включает замену S594Q (AAV5 Capsid VP1 S594Q) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 86.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который включает замену S458Q (AAV5 Capsid VP2 S458Q) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 88.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который включает замену S402Q (AAV5 Capsid VP3 S402Q) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 90.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP1 капсида AAV5, который включает замены S2A S594Q T711S (AAV5 Capsid VP1 S2A S594Q T711S) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 92.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который включает замены S458Q T575S (AAV5 Capsid VP2 S458Q T575S) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 94.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который включает замены S402Q T519S (AAV5 Capsid VP3 S402Q T519S) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 96.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP1 капсида AAV5, который включает замены T614L (AAV5 Capsid VP1 T614L) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 98.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который включает замены T478L (AAV5 Capsid VP2 T478L) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 100.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который включает замены T422L (AAV5 Capsid VP3 T422L) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 102.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP1 капсида AAV5, который включает замены S2A T614L T711S (AAV5 Capsid VP1 S2A T614L T711S) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 104.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который включает замены T478L T575S (AAV5 Capsid VP2 T478L T575S) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 106.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который включает замены (AAV5 Capsid VP3 T422L T519S) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 108.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP1 капсида AAV5, который включает замену

N679K (AAV5 Capsid VP1 N679K) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 110.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который включает замену N543K (AAV5 Capsid VP2 N543K) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 112.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который включает замену N487K (AAV5 Capsid VP3 N487K) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 114.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP1 капсида AAV5, который включает замены S2A N679K T711S (AAV5 Capsid VP1 S2A N679K T711S) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 116.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который включает замены N543K T575S (AAV5 Capsid VP2 N543K T575S) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 118.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который включает замены N487K T519S (AAV5 Capsid VP3 N487K T519S) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 120.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP1 капсида AAV5, который включает замену P723V (AAV5 Capsid VP1 P723V) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 122.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который включает замену P587V (AAV5 Capsid VP2 P587V) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 124.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который включает замену P531V (AAV5 Capsid VP3 P531V) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 126.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP1 капсида AAV5, который включает замены P723V T711S (AAV5 Capsid VP1 S2A P723V T711S) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 128.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который включает замены P587V T575S (AAV5 Capsid VP2 P587V T575S) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 130.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который включает замены P531V T519S (AAV5 Capsid VP3 P531V T519S) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 132.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP1 капсида AAV5, который включает замену V431Y (AAV5 Capsid VP1 V431Y) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 134.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который включает замену V295Y (AAV5 Capsid VP2 V295Y) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 136.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который включает замену V239Y (AAV5 Capsid VP3 V239Y) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 138.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP1 капсида AAV5, который включает замены S2A V431Y T711S (AAV5 Capsid VP1 S2A V431Y T711S) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 140.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который включает замены V295Y T575S (AAV5 Capsid VP2 V295Y T575S) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 142.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который включает замены

V239Y T519S (AAV5 Capsid VP3 V239Y T519S) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 144.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP1 капсида AAV5, который включает замену A616D (AAV5 Capsid VP1 A616D) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 146.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который включает замену A480D (AAV5 Capsid VP2 A480D) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 148.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который включает замену A424D (AAV5 Capsid VP3 A424D) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 150.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP1 капсида AAV5, который включает замены S2A A616D T711S (AAV5 Capsid VP1 S2A A616D T711S) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 152.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который включает замены A480D T575S (AAV5 Capsid VP2 A480D T575S) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 154.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который включает замены A424D T519S (AAV5 Capsid VP3 A424D T519S) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 156.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP1 капсида AAV5, который включает замену W683R (AAV5 Capsid VP1 W683R) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 158.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который включает замену W547R (AAV5 Capsid VP2 W547R) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 160.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который включает замену W491R (AAV5 Capsid VP3 W491R) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 162.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP1 капсида AAV5, который включает замены S2A W683R T711S (AAV5 Capsid VP1 S2A W683R T711S) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 164.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который включает замены W547R T575S (AAV5 Capsid VP2 W547R T575S) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 166.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который включает замены W491R T519S (AAV5 Capsid VP3 W491R T519S) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 168.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP1 капсида AAV5, который включает замену S222A (AAV5 Capsid VP1 S222A) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 170.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который включает замену S86A (AAV5 Capsid VP2 S86A) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 172.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который включает замену S30A (AAV5 Capsid VP3 S30A) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 174.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP1 капсида AAV5, который включает замены S2A S222A T711S (AAV5 Capsid VP1 S2A S222A T711S) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 176.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который включает замены

S86A T575S (AAV5 Capsid VP2 S86A T575S) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 178.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который включает замены S30A T519S (AAV5 Capsid VP3 S30A T519S) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 180.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP1 капсида AAV5, который включает замену R285L (AAV5 Capsid VP1 R285L) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 182.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который включает замену R149L (AAV5 Capsid VP2 R149L) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 184.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который включает замену R93L (AAV5 Capsid VP3 R93L) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 186.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP1 капсида AAV5, который включает замены S2A R285L T711S (AAV5 Capsid VP1 S2A R285L T711S) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 188.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который включает замены R149L T575S (AAV5 Capsid VP2 R149L T575S) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 190.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который включает замены R93L T519S (AAV5 Capsid VP3 R93L T519S) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 192.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP1 капсида AAV5, который включает замену Q340A (AAV5 Capsid VP1 Q340A) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 194.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который включает замену (AAV5 Capsid VP2 Q204A) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 196.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который включает замену Q148A (AAV5 Capsid VP3 Q148A) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 198.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP1 капсида AAV5, который включает замены S2A Q340A T711S (AAV5 Capsid VP1 S2A Q340A T711S) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 200.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который включает замены Q204A T575S (AAV5 Capsid VP2 Q204A T575S) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 202.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который включает замены Q148A T519S (AAV5 Capsid VP3 Q148A T519S) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 204.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP1 капсида AAV5, который включает замену S420F (AAV5 Capsid VP1 S420F) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 206.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который включает замену S284F (AAV5 Capsid VP2 S284F) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 208.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который включает замену S228F (AAV5 Capsid VP3 S228F) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 210.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP1 капсида AAV5, который включает замены S2A S420F T711S (AAV5 Capsid VP1 S2A S420F T711S) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 212.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который включает замены S284F T575S (AAV5 Capsid VP2 S284F T575S) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 214.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который включает замены S228F T519S (AAV5 Capsid VP3 S228F T519S) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 216.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP1 капсида AAV5, который включает замену S680A (AAV5 Capsid VP1 S680A) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 218.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который включает замену S544A (AAV5 Capsid VP2 S544A) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 220.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который включает замену S488A (AAV5 Capsid VP3 S488A) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 222.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP1 капсида AAV5, который включает замены S2A S680A T711S (AAV5 Capsid VP1 S2A S680A T711S) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 224.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который включает замены S544A T575S (AAV5 Capsid VP2 S544A T575S) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 226.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который включает замены S488A T519S (AAV5 Capsid VP3 S488A T519S) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 228.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP1 капсида AAV5, который включает замену

T721V (AAV5 Capsid VP1 T721V) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 230.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который включает замену T585V (AAV5 Capsid VP2 T585V) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 232.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который включает замену T529V (AAV5 Capsid VP3 T529V) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 234.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP1 капсида AAV5, который включает замены S2A T721V T711S (AAV5 Capsid VP1 S2A T721V T711S) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 236.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который включает замены T585V T575S (AAV5 Capsid VP2 T585V T575S) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 238.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который включает замены T529V T519S (AAV5 Capsid VP3 T529V T519S) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 240.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP1 капсида AAV9, который включает замену Q351K (AAV9 Capsid VP1 Q351K) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 242.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP2 капсида AAV9, который включает замену Q214K (AAV9 Capsid VP2 Q214K) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 244.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP3 капсида AAV9, который включает замену Q149K (AAV9 Capsid VP3 Q149K) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 246.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP1 капсида AAV9, который включает замену Q351R (AAV9 Capsid VP1 Q351R) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 248.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP2 капсида AAV9, который включает замену Q214R (AAV9 Capsid VP2 Q214R) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 250.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP3 капсида AAV9, который включает замену Q149R (AAV9 Capsid VP3 Q149R) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 252.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP1 капсида AAV9, который включает замену S232T (AAV9 Capsid VP1 S232T) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 254.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP2 капсида AAV9, который включает замену S95T (AAV9 Capsid VP2 S95T) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 256.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP3 капсида AAV9, который включает замену S30T (AAV9 Capsid VP3 S30T) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 258.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP1 капсида AAV9, который включает замену D297E (AAV9 Capsid VP1 D297E) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 260.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP2 капсида AAV9, который включает замену D160E (AAV9 Capsid VP2 D160E) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 262.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP3 капсида AAV9, который включает замену

D95E (AAV9 Capsid VP3 D95E) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 264.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP1 капсида AAV9, который включает замену S692T (AAV9 Capsid VP1 S692T) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 266.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP2 капсида AAV9, который включает замену S555T (AAV9 Capsid VP2 S555T) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 268.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP3 капсида AAV9, который включает замену S490T (AAV9 Capsid VP3 S490T) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 270.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP1 капсида AAV9, который включает замену D433Y (AAV9 Capsid VP1 D433Y) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 272.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP2 капсида AAV9, который включает замену D296Y (AAV9 Capsid VP2 D296Y) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 274.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP3 капсида AAV9, который включает замену D231Y (AAV9 Capsid VP3 D231Y) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 276.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP1 капсида AAV9, который включает замену T625L (AAV9 Capsid VP1 T625L) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 278.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP2 капсида AAV9, который включает замену T488L (AAV9 Capsid VP2 T488L) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 280.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP3 капсида AAV9, который включает замену T423L (AAV9 Capsid VP3 T423L) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 282.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP1 капсида AAV9, который включает замену T625V (AAV9 Capsid VP1 T625V) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 284.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP2 капсида AAV9, который включает замену T488V (AAV9 Capsid VP2 T488V) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 286.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP3 капсида AAV9, который включает замену T423V (AAV9 Capsid VP3 T423V) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 288.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP1 капсида AAV9, который включает замену N691A (AAV9 Capsid VP1 N691A) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 290.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP2 капсида AAV9, который включает замену N554A (AAV9 Capsid VP2 N554A) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 292.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP3 капсида AAV9, который включает замену N489A (AAV9 Capsid VP3 N489A) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 294.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP1 капсида AAV9, который включает замену C396V (AAV9 Capsid VP1 C396V) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 296.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP2 капсида AAV9, который включает замену

C259V (AAV9 Capsid VP2 C259V) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 298.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP3 капсида AAV9, который включает замену C194V (AAV9 Capsid VP3 C194V) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 300.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP1 капсида AAV9, который включает замену Y478F (AAV9 Capsid VP1 Y478F) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 302.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP2 капсида AAV9, который включает замену Y341F (AAV9 Capsid VP2 Y341F) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 304.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP3 капсида AAV9, который включает замену Y276F (AAV9 Capsid VP3 Y276F) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 306.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP1 капсида AAV9, который включает замену R296L (AAV9 Capsid VP1 R296L) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 308.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP2 капсида AAV9, который включает замену R159L (AAV9 Capsid VP2 R159L) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 310.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP3 капсида AAV9, который включает замену R94L (AAV9 Capsid VP3 R94L) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 312.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP1 капсида AAV9, который включает замену T733V (AAV9 Capsid VP1 T733V) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 314.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP2 капсида AAV9, который включает замену T596V (AAV9 Capsid VP2 T596V) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 316.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP3 капсида AAV9, который включает замену T531V (AAV9 Capsid VP3 T531V) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 318.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP1 капсида AAV9, который включает замену A427R (AAV9 Capsid VP1 A427R) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 320.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP2 капсида AAV9, который включает замену A290R (AAV9 Capsid VP2 A290R) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 322.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP3 капсида AAV9, который включает замену A225R (AAV9 Capsid VP3 A225R) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 324.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP1 капсида AAV9, который включает замену M635D (AAV9 Capsid VP1 M635D) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 326.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP2 капсида AAV9, который включает замену M498D (AAV9 Capsid VP2 M498D) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 328.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP3 капсида AAV9, который включает замену M433D (AAV9 Capsid VP3 M433D) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 330.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP1 капсида AAV9, который включает замену

L444R (AAV9 Capsid VP1 L444R) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 332.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP2 капсида AAV9, который включает замену L307R (AAV9 Capsid VP2 L307R) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 334.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP3 капсида AAV9, который включает замену L242R (AAV9 Capsid VP3 L242R) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 336.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP1 капсида AAV9, который включает замену G604N (AAV9 Capsid VP1 G604N) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 338.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP2 капсида AAV9, который включает замену G467N (AAV9 Capsid VP2 G467N) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 340.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP3 капсида AAV9, который включает замену G402N (AAV9 Capsid VP3 G402N) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 342.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP1 капсида AAV9, который включает замену G627K (AAV9 Capsid VP1 G627K) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 344.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP2 капсида AAV9, который включает замену G490K (AAV9 Capsid VP2 G490K) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 346.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP3 капсида AAV9, который включает замену G425K (AAV9 Capsid VP3 G425K) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 348.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP1 капсида AAV9, который включает замену W695R (AAV9 Capsid VP1 W695R) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 350.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP2 капсида AAV9, который включает замену W558R (AAV9 Capsid VP2 W558R) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 352.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP3 капсида AAV9, который включает замену W493R (AAV9 Capsid VP3 W493R) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 354.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP1 капсида AAV9, который включает замену Q351A (AAV9 Capsid VP1 Q351A) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 356.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP2 капсида AAV9, который включает замену Q214A (AAV9 Capsid VP2 Q214A) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 358.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP3 капсида AAV9, который включает замену Q149A (AAV9 Capsid VP3 Q149A) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 360.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP1 капсида AAV9, который включает замену Y395F (AAV9 Capsid VP1 Y395F) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 362.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP2 капсида AAV9, который включает замену Y258F (AAV9 Capsid VP2 Y258F) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 364.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP3 капсида AAV9, который включает замену

Y193F (AAV9 Capsid VP3 Y193F) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 366.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP1 капсида AAV9, который включает замену R434L (AAV9 Capsid VP1 R434L) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 368.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP2 капсида AAV9, который включает замену R297L (AAV9 Capsid VP2 R297L) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 370.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный капсид AAV включает модифицированный белок VP3 капсида AAV9, который включает замену (AAV9 Capsid VP3 R232L) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 372.

Все вышеуказанные одна или несколько замен модифицированном капсиде AAV рассчитываются относительно соответствующего капсида дикого типа.

Природная последовательность белка VP1 капсида AAV5 дикого типа (AAV5 Capsid VP1 WT) представлена аминокислотной последовательностью SEQ ID No: 2, природная последовательность белка VP2 капсида AAV5 дикого типа (AAV5 Capsid VP2 WT) представлена аминокислотной последовательностью SEQ ID No: 4, природная последовательность белка VP3 капсида AAV5 дикого типа (AAV5 Capsid VP3 WT) представлена аминокислотной последовательностью SEQ ID No: 6.

Природная последовательность белка VP1 капсида AAV9 дикого типа (AAV9 Capsid VP1 WT) представлена аминокислотной последовательностью SEQ ID No: 373, природная последовательность белка VP2 капсида AAV9 дикого типа (AAV9 Capsid VP2 WT) представлена аминокислотной последовательностью SEQ ID No: 375, природная последовательность белка VP3 капсида AAV9 дикого типа (AAV9 Capsid VP3 WT) представлена аминокислотной последовательностью SEQ ID No: 377.

Авторами изобретения было установлено, что вышеуказанные модифицированные капсиды AAV обладают одним или несколькими улучшенными свойствами по сравнению с капсидом AAV без данных модификаций (дикого типа), которые выбирают из группы:

- увеличение эффективности трансдукции клеток,
- увеличение продукции целевого белка,

-увеличение эффективности наработки за счет высокоэффективной продукции (сборки) инкапсидированных вирусных векторов на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV).

Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая модифицированный капсид по изобретению

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к нуклеиновой кислоте, которая кодирует любой из вышеуказанных модифицированных капсидов.

В любом варианте осуществления изобретения молекула нуклеиновой кислоты может быть выделенной.

Термины «нуклеиновая кислота», «нуклеиновая последовательность» или «нуклеиновокислотная последовательность», «полинуклеотид», «олигонуклеотид», «полинуклеотидная последовательность» и «нуклеотидная последовательность», которые используются равнозначно в данном описании, обозначают четкую последовательность нуклеотидов, модифицированных или не модифицированных, определяющую фрагмент или участок нуклеиновой кислоты, содержащую или не содержащую неприродные нуклеотиды и являющуюся либо двухцепочечной ДНК или РНК, либо одноцепочечной ДНК или РНК, либо продуктами транскрипции указанных ДНК.

Как применяют в настоящем описании, полинуклеотиды включают, в качестве неограничивающих примеров, все последовательности нуклеиновой кислоты, получаемые любыми способами, доступными в этой области, включая, в качестве неограничивающих примеров, рекомбинантные способы, т.е. клонирование последовательностей нуклеиновой кислоты из рекомбинантной библиотеки или генома клетки, использование обычной технологии клонирования и ПЦР и т.п., и способами синтеза.

Здесь также следует упомянуть, что данное изобретение не относится к нуклеотидным последовательностям в их природной хромосомной среде, т.е. в природном состоянии. Последовательности данного изобретения были выделены и/или очищены, т.е. были взяты прямо или косвенно, например, путем копирования. Таким образом, также здесь следует подразумевать изолированные нуклеиновые кислоты, полученные путем генетической рекомбинации, например, с помощью принимающих клеток (клеток-хозяев), или полученные путем химического синтеза.

Ссылка на нуклеотидную последовательность охватывает его комплемент, если не указано иное. Таким образом, ссылка на нуклеиновую кислоту, имеющую определенную последовательность следует понимать как охватывающие ее комплементарную цепь с ее комплементарной последовательностью.

«Выделенная» молекула нуклеиновой кислоты представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, которая идентифицирована и отделена от по меньшей мере одной молекулы нуклеиновой кислоты-примеси, с которой она обычно связана в естественном источнике нуклеиновой кислоты антитела. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты отличается от той формы или набора, в которых она находится в естественных условиях. Таким образом, выделенная молекула нуклеиновой кислоты отличается от молекулы нуклеиновой кислоты, существующей в клетках в естественных условиях.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота представляет собой ДНК.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP1 капсида AAV5, который включает замену G226A (AAV5 Capsid VP1 G226A), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 13 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который включает замену G90A (AAV5 Capsid VP2 G90A), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 15 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который включает замену G34A (AAV5 Capsid VP3 G34A), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 17 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP1 капсида AAV5, который включает замены S2A, G226A и T711S (AAV5 Capsid VP1 S2A, G226A и T711S), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 19 или любую другую нуклеотидную

последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который включает замены G90A и T575S (AAV5 Capsid VP2 G90A и T575S), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 21 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который включает замены G34A T519S (AAV5 Capsid VP3 G34A T519S), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 23 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP1 капсида AAV5, который включает замену D286E (AAV5 Capsid VP1 D286E), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 25 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который включает замену D150E (AAV5 Capsid VP2 D150E), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 27 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который включает замену D94E (AAV5 Capsid VP3 D94E), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 29 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую

соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP1 капсида AAV5, который включает замены S2A, D286E и T711S (AAV5 Capsid VP1 S2A, D286E и T711S), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 31 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который включает замены D150E и T575S (AAV5 Capsid VP2 D150E и T575S), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 33 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который включает замены D94E и T519S (AAV5 Capsid VP3 D94E и T519S), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 35 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP1 капсида AAV5, который включает замену L341Y (AAV5 Capsid VP1 L341Y), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 37 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который включает замену L205Y (AAV5 Capsid VP2 L205Y), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 39 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую

соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который включает замену L149Y (AAV5 Capsid VP3 L149Y), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 41 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP1 капсида AAV5, который включает замены S2A, L341Y, T711S (AAV5 Capsid VP1 S2A, L341Y, T711S), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 43 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который включает замены L205Y, T575S (AAV5 Capsid VP2 L205Y, T575S), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 45 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который включает замены L149Y, T519S (AAV5 Capsid VP3 L149Y, T519S), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 47 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP1 капсида AAV5, который включает замену C387V (AAV5 Capsid VP1 C387V), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 49 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую

соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который включает замену C251V (AAV5 Capsid VP2 C251V), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 51 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который включает замену C195V (AAV5 Capsid VP3 C195V), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 53 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP1 капсида AAV5, который включает замены S2A, C387V, T711S (AAV5 Capsid VP1 S2A, C387V, T711S), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 55 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который включает замены C251V, T575S (AAV5 Capsid VP2 C251V, T575S), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 57 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который включает замены C195V, T519S (AAV5 Capsid VP3 C195V, T519S), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 59 или любую другую нуклеотидную

последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP1 капсида AAV5, который включает замену Q421H (AAV5 Capsid VP1 Q421H), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 61 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который включает замену Q285H (AAV5 Capsid VP2 Q285H), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 63 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который включает замену Q229H (AAV5 Capsid VP3 Q229H), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 65 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP1 капсида AAV5, который включает замены S2A Q421H T711S (AAV5 Capsid VP1 S2A Q421H T711S), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 67 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который включает замены Q285H T575S (AAV5 Capsid VP2 Q285H T575S), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 69 или любую другую нуклеотидную

последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который включает замены Q229H T519S (AAV5 Capsid VP3 Q229H T519S), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 71 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP1 капсида AAV5, который включает замену P466T (AAV5 Capsid VP1 P466T), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 73 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который включает замену P330T (AAV5 Capsid VP2 P330T), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 75 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который включает замену P274T (AAV5 Capsid VP3 P274T), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 77 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP1 капсида AAV5, который включает замены S2A P466T T711S (AAV5 Capsid VP1 S2A P466T T711S), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 79 или любую другую нуклеотидную

последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который включает замены P330T T575S (AAV5 Capsid VP2 P330T T575S), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 81 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который включает замены P274T T519S (AAV5 Capsid VP3 P274T T519S), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 83 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP1 капсида AAV5, который включает замену S594Q (AAV5 Capsid VP1 S594Q), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 85 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который включает замену S458Q (AAV5 Capsid VP2 S458Q), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 87 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который включает замену S402Q (AAV5 Capsid VP3 S402Q), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 89 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую

соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую. кислоту, кодирующую модифицированный белок VP1 капсида AAV5, который включает замены S2A S594Q T711S (AAV5 Capsid VP1 S2A S594Q T711S), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 91 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую. кислоту, кодирующую модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который включает замены S458Q T575S (AAV5 Capsid VP2 S458Q T575S), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 93 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую. кислоту, кодирующую модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который включает замены S402Q T519S (AAV5 Capsid VP3 S402Q T519S), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 95 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую. кислоту, кодирующую модифицированный белок VP1 капсида AAV5, который включает замены T614L (AAV5 Capsid VP1 T614L), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 97 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую. кислоту, кодирующую модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который включает замены T478L (AAV5 Capsid VP2 T478L), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 99 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую

соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую. кислоту, кодирующую модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который включает замены T422L (AAV5 Capsid VP3 T422L), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 101 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую. кислоту, кодирующую модифицированный белок VP1 капсида AAV5, который включает замены S2A T614L T711S (AAV5 Capsid VP1 S2A T614L T711S), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 103 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую. кислоту, кодирующую модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который включает замены T478L T575S (AAV5 Capsid VP2 T478L T575S), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 105 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую. кислоту, кодирующую модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который включает замены (AAV5 Capsid VP3 T422L T519S), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 107 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую. кислоту, кодирующую модифицированный белок VP1 капсида AAV5, который включает замен N679K (AAV5 Capsid VP1 N679K), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 109 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую

соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую. кислоту, кодирующую модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который включает замену N543K (AAV5 Capsid VP2 N543K), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 111 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую. кислоту, кодирующую модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который включает замену N487K (AAV5 Capsid VP3 N487K), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 113 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую. кислоту, кодирующую модифицированный белок VP1 капсида AAV5, который включает замены S2A N679K T711S (AAV5 Capsid VP1 S2A N679K T711S), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 115 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую. кислоту, кодирующую модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который включает замены N543K T575S (AAV5 Capsid VP2 N543K T575S), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 117 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую. кислоту, кодирующую модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который включает замены N487K T519S (AAV5 Capsid VP3 N487K T519S), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 119 или любую другую нуклеотидную

последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP1 капсида AAV5, который включает замену P723V (AAV5 Capsid VP1 P723V), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 121 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который включает замену P587V (AAV5 Capsid VP2 P587V), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 123 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который включает замену P531V (AAV5 Capsid VP3 P531V), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 125 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP1 капсида AAV5, который включает замены P723V T711S (AAV5 Capsid VP1 S2A P723V T711S), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 127 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который включает замены P587V T575S (AAV5 Capsid VP2 P587V T575S), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 129 или любую другую нуклеотидную

последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который включает замены P531V T519S (AAV5 Capsid VP3 P531V T519S), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 131 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP1 капсида AAV5, который включает замену V431Y (AAV5 Capsid VP1 V431Y), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 133 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который включает замену V295Y (AAV5 Capsid VP2 V295Y), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 135 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который включает замену V239Y (AAV5 Capsid VP3 V239Y), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 137 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP1 капсида AAV5, который включает замены S2A V431Y T711S (AAV5 Capsid VP1 S2A V431Y T711S), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 139 или любую другую нуклеотидную

последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который включает замены V295Y T575S (AAV5 Capsid VP2 V295Y T575S), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 141 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который включает замены V239Y T519S (AAV5 Capsid VP3 V239Y T519S), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 143 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP1 капсида AAV5, который включает замену A616D (AAV5 Capsid VP1 A616D), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 145 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который включает замену A480D (AAV5 Capsid VP2 A480D), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 147 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который включает замену A424D (AAV5 Capsid VP3 A424D), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 149 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую

соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую. кислоту, кодирующую модифицированный белок VP1 капсида AAV5, который включает замены S2A A616D T711S (AAV5 Capsid VP1 S2A A616D T711S), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 151 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую. кислоту, кодирующую модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который включает замены A480D T575S (AAV5 Capsid VP2 A480D T575S), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 153 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую. кислоту, кодирующую модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который включает замены A424D T519S (AAV5 Capsid VP3 A424D T519S), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 155 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую. кислоту, кодирующую модифицированный белок VP1 капсида AAV5, который включает замену W683R (AAV5 Capsid VP1 W683R), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 157 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую. кислоту, кодирующую модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который включает замену W547R (AAV5 Capsid VP2 W547R), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 159 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую

соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который включает замену W491R (AAV5 Capsid VP3 W491R), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 161 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP1 капсида AAV5, который включает замены S2A W683R T711S (AAV5 Capsid VP1 S2A W683R T711S), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 163 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который включает замены W547R T575S (AAV5 Capsid VP2 W547R T575S), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 165 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который включает замены W491R T519S (AAV5 Capsid VP3 W491R T519S), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 167 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP1 капсида AAV5, который включает замену S222A (AAV5 Capsid VP1 S222A), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 169 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую

соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую. кислоту, кодирующую модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который включает замену S86A (AAV5 Capsid VP2 S86A), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 171 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую. кислоту, кодирующую модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который включает замену S30A (AAV5 Capsid VP3 S30A), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 173 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую. кислоту, кодирующую модифицированный белок VP1 капсида AAV5, который включает замены S2A S222A T711S (AAV5 Capsid VP1 S2A S222A T711S), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 175 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую. кислоту, кодирующую модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который включает замены S86A T575S (AAV5 Capsid VP2 S86A T575S), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 177 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую. кислоту, кодирующую модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который включает замены S30A T519S (AAV5 Capsid VP3 S30A T519S), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 179 или любую другую нуклеотидную

последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP1 капсида AAV5, который включает замену R285L (AAV5 Capsid VP1 R285L), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 181 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который включает замену R149L (AAV5 Capsid VP2 R149L), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 183 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который включает замену R93L (AAV5 Capsid VP3 R93L), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 185 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP1 капсида AAV5, который включает замены S2A R285L T711S (AAV5 Capsid VP1 S2A R285L T711S), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 187 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который включает замены R149L T575S (AAV5 Capsid VP2 R149L T575S), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 189 или любую другую нуклеотидную

последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который включает замены R93L T519S (AAV5 Capsid VP3 R93L T519S), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 191 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP1 капсида AAV5, который включает замену Q340A (AAV5 Capsid VP1 Q340A), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 193 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который включает замену (AAV5 Capsid VP2 Q204A), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 195 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который включает замену Q148A (AAV5 Capsid VP3 Q148A), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 197 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP1 капсида AAV5, который включает замены S2A Q340A T711S (AAV5 Capsid VP1 S2A Q340A T711S), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 199 или любую другую нуклеотидную

последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который включает замены Q204A T575S (AAV5 Capsid VP2 Q204A T575S), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 201 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который включает замены Q148A T519S (AAV5 Capsid VP3 Q148A T519S), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 203 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP1 капсида AAV5, который включает замену S420F (AAV5 Capsid VP1 S420F), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 205 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который включает замену S284F (AAV5 Capsid VP2 S284F), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 207 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который включает замену S228F (AAV5 Capsid VP3 S228F), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 209 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую

соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую. кислоту, кодирующую модифицированный белок VP1 капсида AAV5, который включает замены S2A S420F T711S (AAV5 Capsid VP1 S2A S420F T711S), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 211 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую. кислоту, кодирующую модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который включает замены S284F T575S (AAV5 Capsid VP2 S284F T575S), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 213 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую. кислоту, кодирующую модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который включает замены S228F T519S (AAV5 Capsid VP3 S228F T519S), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 215 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую. кислоту, кодирующую модифицированный белок VP1 капсида AAV5, который включает замену S680A (AAV5 Capsid VP1 S680A), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 217 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую. кислоту, кодирующую модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который включает замену S544A (AAV5 Capsid VP2 S544A), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 219 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую

соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который включает замену S488A (AAV5 Capsid VP3 S488A), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 221 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP1 капсида AAV5, который включает замены S2A S680A T711S (AAV5 Capsid VP1 S2A S680A T711S), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 223 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который включает замены S544A T575S (AAV5 Capsid VP2 S544A T575S), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 225 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который включает замены S488A T519S (AAV5 Capsid VP3 S488A T519S), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 227 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP1 капсида AAV5, который включает замену T721V (AAV5 Capsid VP1 T721V), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 229 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую

соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который включает замену T585V (AAV5 Capsid VP2 T585V), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 231 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который включает замену T529V (AAV5 Capsid VP3 T529V), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 233 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP1 капсида AAV5, который включает замены S2A T721V T711S (AAV5 Capsid VP1 S2A T721V T711S), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 235 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP2 капсида AAV5, который включает замены T585V T575S (AAV5 Capsid VP2 T585V T575S), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 237 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP3 капсида AAV5, который включает замены T529V T519S (AAV5 Capsid VP3 T529V T519S), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 239 или любую другую нуклеотидную

последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP1 капсида AAV9, который включает замену Q351K (AAV9 Capsid VP1 Q351K), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 241 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP2 капсида AAV9, который включает замену Q214K (AAV9 Capsid VP2 Q214K), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 243 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP3 капсида AAV9, который включает замену Q149K (AAV9 Capsid VP3 Q149K), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 245 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP1 капсида AAV9, который включает замену Q351R (AAV9 Capsid VP1 Q351R), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 247 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP2 капсида AAV9, который включает замену Q214R (AAV9 Capsid VP2 Q214R), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 249 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую

соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP3 капсида AAV9, который включает замену Q149R (AAV9 Capsid VP3 Q149R), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 251 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP1 капсида AAV9, который включает замену S232T (AAV9 Capsid VP1 S232T), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 253 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP2 капсида AAV9, который включает замену S95T (AAV9 Capsid VP2 S95T), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 255 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP3 капсида AAV9, который включает замену S30T (AAV9 Capsid VP3 S30T), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 257 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP1 капсида AAV9, который включает замену D297E (AAV9 Capsid VP1 D297E), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 259 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую

соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP2 капсида AAV9, который включает замену D160E (AAV9 Capsid VP2 D160E), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 261 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP3 капсида AAV9, который включает замену D95E (AAV9 Capsid VP3 D95E), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 263 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP1 капсида AAV9, который включает замену S692T (AAV9 Capsid VP1 S692T), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 265 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP2 капсида AAV9, который включает замену S555T (AAV9 Capsid VP2 S555T), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 267 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP3 капсида AAV9, который включает замену S490T (AAV9 Capsid VP3 S490T), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 269 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую

соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP1 капсида AAV9, который включает замену D433Y (AAV9 Capsid VP1 D433Y), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 271 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP2 капсида AAV9, который включает замену D296Y (AAV9 Capsid VP2 D296Y), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 273 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP3 капсида AAV9, который включает замену D231Y (AAV9 Capsid VP3 D231Y), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 275 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP1 капсида AAV9, который включает замену T625L (AAV9 Capsid VP1 T625L), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 277 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP2 капсида AAV9, который включает замену T488L (AAV9 Capsid VP2 T488L), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 279 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую

соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP3 капсида AAV9, который включает замену T423L (AAV9 Capsid VP3 T423L), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 281 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP1 капсида AAV9, который включает замену T625V (AAV9 Capsid VP1 T625V), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 283 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP2 капсида AAV9, который включает замену T488V (AAV9 Capsid VP2 T488V), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 285 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP3 капсида AAV9, который включает замену T423V (AAV9 Capsid VP3 T423V), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 287 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP1 капсида AAV9, который включает замену N691A (AAV9 Capsid VP1 N691A), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 289 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую

соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP2 капсида AAV9, который включает замену N554A (AAV9 Capsid VP2 N554A), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 291 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP3 капсида AAV9, который включает замену N489A (AAV9 Capsid VP3 N489A), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 293 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP1 капсида AAV9, который включает замену C396V (AAV9 Capsid VP1 C396V), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 295 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP2 капсида AAV9, который включает замену C259V (AAV9 Capsid VP2 C259V), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 297 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP3 капсида AAV9, который включает замену C194V (AAV9 Capsid VP3 C194V), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 299 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую

соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP1 капсида AAV9, который включает замену Y478F (AAV9 Capsid VP1 Y478F), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 301 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP2 капсида AAV9, который включает замену Y341F (AAV9 Capsid VP2 Y341F), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 303 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP3 капсида AAV9, который включает замену Y276F (AAV9 Capsid VP3 Y276F), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 305 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP1 капсида AAV9, который включает замену R296L (AAV9 Capsid VP1 R296L), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 307 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP2 капсида AAV9, который включает замену R159L (AAV9 Capsid VP2 R159L), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 309 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую

соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP3 капсида AAV9, который включает замену R94L (AAV9 Capsid VP3 R94L), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 311 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP1 капсида AAV9, который включает замену T733V (AAV9 Capsid VP1 T733V), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 313 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP2 капсида AAV9, который включает замену T596V (AAV9 Capsid VP2 T596V), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 315 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP3 капсида AAV9, который включает замену T531V (AAV9 Capsid VP3 T531V), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 317 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP1 капсида AAV9, который включает замену A427R (AAV9 Capsid VP1 A427R), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 319 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую

соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP2 капсида AAV9, который включает замену A290R (AAV9 Capsid VP2 A290R), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 321 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP3 капсида AAV9, который включает замену A225R (AAV9 Capsid VP3 A225R), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 323 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP1 капсида AAV9, который включает замену M635D (AAV9 Capsid VP1 M635D), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 325 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP2 капсида AAV9, который включает замену M498D (AAV9 Capsid VP2 M498D), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 327 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP3 капсида AAV9, который включает замену M433D (AAV9 Capsid VP3 M433D), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 329 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую

соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP1 капсида AAV9, который включает замену L444R (AAV9 Capsid VP1 L444R), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 331 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP2 капсида AAV9, который включает замену L307R (AAV9 Capsid VP2 L307R), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 333 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP3 капсида AAV9, который включает замену L242R (AAV9 Capsid VP3 L242R), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 335 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP1 капсида AAV9, который включает замену G604N (AAV9 Capsid VP1 G604N), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 337 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP2 капсида AAV9, который включает замену G467N (AAV9 Capsid VP2 G467N), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 339 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую

соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP3 капсида AAV9, который включает замену G402N (AAV9 Capsid VP3 G402N), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 341 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP1 капсида AAV9, который включает замену G627K (AAV9 Capsid VP1 G627K), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 343 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP2 капсида AAV9, который включает замену G490K (AAV9 Capsid VP2 G490K), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 345 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP3 капсида AAV9, который включает замену G425K (AAV9 Capsid VP3 G425K), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 347 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP1 капсида AAV9, который включает замену W695R (AAV9 Capsid VP1 W695R), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 349 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую

соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP2 капсида AAV9, который включает замену W558R (AAV9 Capsid VP2 W558R), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 351 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP3 капсида AAV9, который включает замену W493R (AAV9 Capsid VP3 W493R), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 353 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP1 капсида AAV9, который включает замену Q351A (AAV9 Capsid VP1 Q351A), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 355 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP2 капсида AAV9, который включает замену Q214A (AAV9 Capsid VP2 Q214A), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 357 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP3 капсида AAV9, который включает замену Q149A (AAV9 Capsid VP3 Q149A), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 359 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую

соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP1 капсида AAV9, который включает замену Y395F (AAV9 Capsid VP1 Y395F), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 361 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP2 капсида AAV9, который включает замену Y258F (AAV9 Capsid VP2 Y258F), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 363 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP3 капсида AAV9, который включает замену Y193F (AAV9 Capsid VP3 Y193F), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 365 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP1 капсида AAV9, который включает замену R434L (AAV9 Capsid VP1 R434L), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: SEQ ID No: 367 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP2 капсида AAV9, который включает замену R297L (AAV9 Capsid VP2 R297L), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 369 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую

соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует модифицированный капсид, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный белок VP3 капсида AAV9, который включает замену (AAV9 Capsid VP3 R232L), которая имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No: 371 или любую другую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка.

Под «любой другой нуклеотидной последовательность, кодирующей соответствующую аминокислотную последовательность данного модифицированного белка» подразумевается нуклеиновая последовательность, которая альтернативна указанной нуклеиновой последовательности, так как с учетом вырожденности генетического кода широкий ряд различных ДНК-последовательностей может кодировать одну и ту же аминокислотную последовательность. Специалистам в данной области хорошо известно получение таких альтернативных ДНК-последовательностей, кодирующих одни и те же аминокислотные последовательности. Такие варианты ДНК-последовательности находятся в объеме настоящего изобретения.

В некоторых вариантах выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует любой из вышеуказанных модифицированных капсидов, включает любую из вышеуказанных последовательностей нуклеиновых кислот или их комбинации.

Вектор на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к вектору на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса для доставки субъекту гетерологичной последовательности нуклеиновой кислоты, который включает:

- 1) любой из вышеуказанных модифицированных капсидов, и
- 2) гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую регуляторные последовательности, которые обеспечивают экспрессию продукта, кодируемого гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты, в целевых клетках.

Термины «вектор на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса», «рекомбинантный вирус на основе AAV», «вирусоподобная частица на основе AAV», «рекомбинантный вирусный штамм AAV», «рекомбинантный вектор AAV» или «вектор на основе гAAV» в контексте настоящего описания имеют одинаковое значение.

В некоторых вариантах осуществления изобретения вектор на основе гAAV включает гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую регуляторные последовательности, которые обеспечивают экспрессию продукта, где продукт экспрессии гетерологичной последовательности нуклеиновой кислоты представляет собой терапевтический полипептид или репортерный полипептид.

Вектор на основе гAAV по изобретению не содержит нуклеотидные последовательности генов, кодирующих последовательности белков (Rep), необходимых для обеспечения жизненного цикла вируса, а также последовательности перекрывающихся белков капсида (Cap).

Характеристика капсида подробно описана в вышеуказанном разделе описания.

Под «регуляторными последовательностями, которые обеспечивают экспрессию продукта, кодируемого гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты, в целевых клетках» подразумевается в рамках данного изобретения полинуклеотидные последовательности, которые необходимы для воздействия на экспрессию и процессинг кодирующих последовательностей, к которым они клонированы. Регулирующие экспрессию последовательности включают соответствующие последовательности инициации транскрипции, терминации, промотора и энхансера; эффективные сигналы процессинга РНК, такие как сплайсинг и сигналы полиаденилирования; последовательности, которые стабилизируют цитоплазматическую мРНК; последовательности, которые повышают эффективность трансляции (т.е. консенсусная последовательность Козака); последовательности, которые повышают стабильность белка; и, при желании, последовательности, которые усиливают секрецию белка. Характер таких регулирующих последовательностей различается в зависимости от организма-хозяина; в прокариотах такие контролирующие последовательности, как правило, включают промотор, сайт связывания рибосомы, а также последовательности терминации транскрипции; в эукариотах, как правило, такие контролирующие последовательности включают промоторы и последовательности терминации транскрипции. Термин «регуляторные последовательности» включает, как минимум, все компоненты, наличие которых имеет важное значение для экспрессии и процессинга, и может также включать дополнительные компоненты, чье присутствие является полезным, например, последовательности лидерных пептидов.

В контексте настоящего описания термин «промотор» относится к фрагменту нуклеиновой кислоты, который контролирует транскрипцию одной или нескольких кодирующих последовательностей, а также который структурно идентифицируется по

наличию сайта связывания для ДНК-зависимой РНК-полимеразы, сайтов инициации транскрипции и других последовательностей ДНК, включающих, без ограничения, сайты связывания фактора транскрипции, сайты связывания репрессора и активатора белка, а также любые другие последовательности нуклеотидов, известные специалистам в данной области, которые непосредственно или опосредованно регулируют уровень транскрипции с данным промотором. «Конститутивный» промотор представляет собой такой промотор, который активен в большинстве тканей в обычных физиологических условиях и условиях развития. «Индукцибельный» промотор представляет собой промотор, который подвергается физиологической регуляции или регуляции в ходе развития, например, при воздействии химического индуктора. «Тканеспецифичный» промотор активен только в конкретных типах тканей или клеток.

Промоторы, которые используются для продукции высокого уровня полипептидов в эукариотических клетках и, в частности, в клетках млекопитающих, должны быть сильными и, предпочтительно, должны быть активными в широком диапазоне типов клеток. Сильные конститутивные промоторы, которые способны запускать экспрессию во многих типах клеток, хорошо известны в данной области и, поэтому, нет необходимости в их подробном описании в данном документе. В соответствии с идеей настоящего изобретения предпочтительно использовать промотор цитомегаловируса (CMV). Промотор или промотор/энхансер, полученные из немедленной ранней (IE) области цитомегаловируса (hCMV) человека, в особенности подходят в качестве промотора для вектора на основе гAAV5 по настоящему изобретению. Немедленная ранняя (IE) область цитомегаловируса (hCMV) человека и полученные из нее функциональные запускающие экспрессию фрагменты и/или функциональные усиливающие экспрессию фрагменты, например, описаны в EP0173177 и EP0323997, а также хорошо известны в данной области. Таким образом, несколько фрагментов немедленной ранней (IE) области hCMV могут использоваться в качестве промотора и/или промотора/энхансера.

Термины «энхансеры» или «энхансер», используемые в изобретении, могут относиться к последовательности ДНК, которая расположена как смежная с последовательностью ДНК, кодирующей рекомбинантный продукт. Энхансерные элементы обычно расположены в 5'-направлении от промоторного элемента или могут быть расположены ниже или в пределах кодирующей последовательности ДНК (например, последовательности ДНК, транскрибированной или транслированной в рекомбинантный продукт или продукты). Таким образом, энхансерный элемент может быть расположен на расстоянии 100 пар оснований, 200 пар оснований или 300 или больше пар оснований перед последовательностью ДНК, которая кодирует рекомбинантный продукт, или после этой

последовательности. Эnhансерные элементы могут увеличивать количество экспрессируемого рекомбинантного продукта от последовательности ДНК, превышая экспрессию, обусловленную одиночным промоторным элементом. Специалистам в данной области техники доступно множество эnhансерных элементов.

В некоторых вариантах осуществления изобретения гетерологичная последовательность нуклеиновой кислоты, содержащая регуляторные последовательности, которые обеспечивают экспрессию продукта, кодируемого гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты, в целевых клетках может включать следующие элементы в направлении от 5'-конца к 3'-концу:

левый (первый) ITR (инвертированные концевые повторы);

CMV (цитомегаловирусный) эnhансер;

CMV (цитомегаловирусный) промотор;

интрон гена hBG1 (ген субъединицы гемоглобина гамма-1);

нуклеиновая кислота, кодирующая продукт;

сигнал полиаденилирования hGH1 (сигнал полиаденилирования гена гормона роста человека);

правый (второй) ITR.

В некоторых вариантах реализации нуклеиновая кислота, кодирующая продукт (трансген) представляет собой по меньшей мере один ген, кодирующий белок. В некоторых вариантах реализации трансген кодирует по меньшей мере одну небольшую нуклеиновую кислоту-ингибитор. В некоторых вариантах реализации трансген кодирует по меньшей мере одну репортерную молекулу. В некоторых вариантах реализации малая ингибирующая нуклеиновая кислота представляет собой miRNA. В некоторых вариантах реализации малая ингибирующая нуклеиновая кислота представляет собой sponge miRNA или TuD-RNA, которая ингибирует активность по меньшей мере одной miRNA у животного. В некоторых вариантах реализации miRNA экспрессируется в клетке ткани-мишени. В некоторых вариантах реализации ткань-мишень представляет собой ткань печени, центральной нервной системы (ЦНС), глаз, желудочно-кишечного тракта, дыхательных путей, молочной железы, поджелудочной железы, мочевыводящих путей или ткани матки.

В некоторых вариантах вектор на основе gAAV имеет продукт экспрессии гетерологичной последовательности нуклеиновой кислоты, который представляет собой терапевтический полипептид или репортерный полипептид.

В некоторых вариантах вектор на основе gAAV содержит гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей продукт, который представляет

собой терапевтический полипептид, где терапевтический полипептид представляет собой фактор свертывания крови, выбираемый из группы, состоящей из фактора VIII, фактора IX или их функционального варианта.

В некоторых вариантах вектор на основе гAAV содержит гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей продукт, который представляет собой фактор VIII или его функциональный вариант.

В некоторых вариантах вектор на основе гAAV содержит гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей продукт, который представляет собой фактор IX или его функциональный вариант.

В некоторых вариантах вектор на основе гAAV содержит гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей продукт, который представляет собой белок SMN1 (белок выживаемости моторных (двигательных) нейронов)

В некоторых вариантах вектор на основе гAAV содержит гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей продукт, который представляет собой полипептид RBD-S (рекомбинантный рецептор-связывающий домен гликопротеина S) вируса SARS-cov2 (коронавирус 2 типа, вызывающий тяжёлый острый респираторный синдром).

Примеры

Для наилучшего понимания изобретения приводятся следующие примеры. Эти примеры приведены только в иллюстративных целях и не должны толковаться как ограничивающие сферу применения изобретения в любой форме.

Все публикации, патенты и патентные заявки, указанные в этой спецификации включены в данный документ путем отсылки. Хотя вышеупомянутое изобретение было довольно подробно описано путем иллюстрации и примера в целях исключения двусмысленного толкования, специалистам в данной области на основе идей, раскрытых в данном изобретении, будет вполне понятно, что могут быть внесены определенные изменения и модификации без отклонения от сущности и объема прилагаемых вариантов осуществления изобретения.

Материалы и общие методы

Методы рекомбинантной ДНК

Для манипуляций с ДНК использовали стандартные методы, описанные у Sambrook J. и др., Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2012. Реагенты для молекулярной биологии использовали согласно инструкциям производителей.

Синтез генов

Требуемые сегменты генов получали из олигонуклеотидов, созданных путем химического синтеза. Генные сегменты длиной от 300 до 4000 п.н., которые фланкированы уникальными сайтами рестрикции, собирали путем отжига и лигирования олигонуклеотидов, включая ПЦР-амплификацию и последующее клонирование через указанные сайты рестрикции. Последовательности ДНК субклонированных генных фрагментов подтверждали путем секвенирования ДНК.

Определение последовательностей ДНК

Последовательности ДНК определяли путем секвенирования по Сенгеру.

Анализ последовательностей ДНК и белков и обработка данных о последовательностях

Применяли пакет программ Infomax's Vector NTI Advance suite, версия 8.0 и SnapGene версии 5.1.4.1 для создания, картирования, анализа, аннотирования и иллюстрации последовательностей.

Статистический анализ данных

Результаты представлены в виде среднего значения $\pm$ стандартное отклонение (SD), для сравнения результатов теста и контроля использовали дисперсионный анализ (ANOVA), и они были определены как статистически значимые.

Пример 1.

Выбор вариантов мутаций в капсиде AAV5 на основе структурного сходства капсидов семейства парвовирусов

Дизайн мутаций капсида AAV5 основан на высокой степени структурного сходства белков капсида внутри семейства парвовирусов (Parvoviridae), в том числе вирусов, не относящихся к AAV. Подбор замены состоит из трёх этапов и включает в себя:

- 1) Определение аминокислот белка-капсомера AAV5, расположенных в области интерфейса взаимодействия соседних пентамерных субъединиц капсида;
- 2) структурное выравнивание модифицируемого капсида AAV5 с капсидом одного из парвовирусов, не являющихся AAV (далее «капсид-шаблон»);
- 3) попарное сравнение остатков аминокислот капсида AAV5 и капсида-шаблона.

Предварительно проводится подготовка структур трехмерных моделей AAV5 и капсида-шаблона, которая заключается в достраивании отсутствующих атомов в структуре с помощью утилиты Prepwizard из пакета Schrodinger Suite.

В пункте 1 под интерфейсом взаимодействия понимается набор фрагментов полипептидной цепи белка-капсомера, взаимодействующих с аминокислотами соседней пентамерной субъединицы, где под пентамерной субъединицей понимается структурный элемент капсида в форме правильного пятиугольника, состоящий из 5 белков-капсомеров,

расположенных вокруг центральной поры (L. M. Drouin and M. Agbandje-McKenna. Adeno-associated virus structural biology as a tool in vector development. *Future Virol.*, vol. 8, no. 12, pp. 1183–1199, 2013.).

На втором этапе проводится структурное выравнивание капсида AAV5 и капсида-шаблона с помощью утилиты Structure Alignment пакета Schrodinger Suite. По итогам выравнивания для каждой аминокислоты AAV5 из интерфейса взаимодействия соседних пентамерных субъединиц определяется ближайшая к ней аминокислота капсида-шаблона (структурный аналог исходной аминокислоты), которая рассматривается в качестве потенциальной замены. Структурный аналог исходной аминокислоты отсутствует, если в окрестности ближайшей к ней аминокислоты капсида-шаблона расположена другая аминокислота AAV5, расстояние до которой меньше, чем до исходной аминокислоты. Здесь подразумевается, что расстояние между аминокислотами оценивается по расстоянию между альфа-атомами углерода.

После того, как для всех аминокислот интерфейса взаимодействия соседних пентамерных субъединиц определены структурные аналоги, решение о замене принимается в соответствии с Примерами 2, 3 и 4.

Пример 2. Дизайн мутаций по принципу увеличения объема остатка аминокислоты

По итогам структурного выравнивания капсида AAV5 и капсида-шаблона имеем попарное структурное соответствие между их аминокислотными остатками. В одном из случаев решение о замене исходной аминокислоты на соответствующую аминокислоту капсида-шаблона принимается по итогам сравнения объемов Ван-дер-Ваальса боковых заместителей аминокислот (N. J. Darby, S. S. N. J. Darby, and T. E. Creighton, *Protein Structure*. IRL Press at Oxford University Press, 1993; таблица 1). Мутация вносится при соблюдении следующих условий:

1. Объем бокового заместителя аминокислоты из капсида-шаблона больше, чем объем бокового заместителя исходной аминокислоты

2. Аминокислота из капсида шаблона не является цистеином или метионином.

Исключение цистеина и метионина из числа аминокислот для потенциальной замены обусловлено их значительной реакционной способностью, в частности способностью к окислению.

Таблица 1. Объем Ван-дер-Ваальса для боковых заместителей аминокислот (N. J. Darby, S. S. N. J. Darby, and T. E. Creighton, *Protein Structure*. IRL Press at Oxford University Press, 1993.)

Трёхбуквенный код	Однобуквенный код	Объем, Å ³
-------------------	-------------------	-----------------------

Ala	A	67
Arg	R	148
Asp	D	96
Asn	N	91
Cys	C	86
Gln	Q	114
Glu	E	109
Gly	G	48
His	H	118
Ile	I	124
Leu	L	124
Lys	K	135
Met	M	124
Phe	F	135
Pro	P	90
Ser	S	73
Thr	T	93
Trp	W	163
Tyr	Y	141
Val	V	105

Результаты применения описываемого способа дизайна мутаций в капсиде AAV5 с использованием трёх капсидов-шаблонов: HBoV1 (PDBid 5urf), B19 (PDBid 1s58), BPV (PDBid 4qc8) приведены в таблице 2. В первой колонке указаны аминокислоты из интерфейса взаимодействия соседних пентамерных субъединиц капсида AAV5, в остальных колонках приведены аминокислоты, полученные по итогам попарного структурного выравнивания AAV5 на каждый из капсидов HBoV1, B19 и BPV. Звездочкой отмечены аминокислоты, пригодные для замены в соответствии с критерием размера бокового заместителя и запретом замены на цистеин и метионин.

Под интерфейсом взаимодействия для данной субъединицы мы понимаем все аминокислоты, хотя бы один атом которых находится на расстоянии, не превышающем 5 Å от какого-либо атома из соседних пентамерных субъединиц.

Для AAV5 мы производили расчет по структуре капсида PDB ID: 6JCT.

В ней, согласно расчету, к интерфейсу взаимодействия между соседними пентамерными субъединицами AAV5 относятся следующие диапазоны остатков белка VP1

капсида AAV5: 220 – 226, 283 – 293, 339 – 342, 385 – 392, 412 – 435, 462 – 466, 590 – 598, 611 – 626, 677 – 685, 721-724.

Таблица 2. Аминокислоты из интерфейса взаимодействия соседних пентамерных субъединиц капсида AAV5 и структурно соответствующие им аминокислоты капсомеров B19, HBoV1 и BPV. Звездочкой отмечены аминокислоты, боковой заместитель которых больше, чем у исходной аминокислоты капсомера AAV5. Прочерком отмечен факт отсутствия структурно аналогичной аминокислоты в капсиде шаблона.

AAV5	B19	HBoV1	BPV
C220	E*	G	G
D221	G	G	G
S222	A	T*	S
T223	T	I*	H*
W224	F	F	F
M225	S	S	S
G226	A*	E*	D*
S283	S	S	S
P284	P	P	P
R285	L	N	Q
D286	E*	D	D
W287	F	W	W
Q288	Q	Q	Q
R289	H	H	R
L290	L	L	L
I291	I	V	T
N292	E*	N	N
N293	N	D*	E*
Y339	Y	H	H
Q340	K*	R*	A
L341	Y*	Y*	Y*
P342	P	P	P
F385	F	L	F
F386	Y*	Y*	F
C387	V*	M	L*
L388	L	L	L

E389	E	E	E
Y390	H	N	N
F391	S	S	S
P392	S	D*	D*
P412	P	E*	E*
F413	P	W*	W*
H414	E	I*	V
S415	N*	E*	N*
S416	L*	N*	N*
F417	E	N	E
A418	G	I*	R*
P419	C	T*	A
S420	Q*	F*	Y*
Q421	H*	S	I*
N422	-	M	P
L423	F*	P	P
F424	Y*	Q	G
K425	E	M	L
L426	M	M	M
A427	Y*	Y*	F*
N428	N	N	N
P429	P	P	P
L430	L	L	K*
V431	Y*	V	V
D432	G	R*	P
Q433	S	S	T
Y434	R*	R*	R*
L435	L	R*	R*
K462	Q	S	T
N463	N	N	S
W464	F	W	W
F465	M	M	M
P466	P	S	T*
I590	L	M	M

V591	M	L*	F*
P592	V*	P	P
G593	G	N*	N*
S594	S	Q*	Q*
V595	V	M	V
W596	W	W	W
M597	N	D	D
E598	R*	S	R*
I611	I	V	K*
P612	P	P	P
E613	N	R*	R*
T614	L*	V*	A
G615	D*	N*	D*
A616	D*	R*	K*
H617	S	K*	H
F618	F	T	T
H619	K*	L*	I*
P620	T*	L*	M
S621	F*	D*	D*
P622	A	T*	P
A623	A	Q*	F*
M624	L	D	D
G625	G	G	G
G626	G	S*	S*
K677	P	K	R*
E678	R*	R*	Y*
N679	K*	G	A
S680	A	T*	T*
K681	T	K	K
R682	G	N	N
W683	R	W	W
N684	N	R*	R*
P685	P	P	P
T721	V*	H*	N

R722	H	K	K
P723	P	V*	V*
L724	L	L	L

Пример 3. Дизайн мутаций по принципу увеличения числа полярных контактов между капсомерами.

В соответствие с Примером 1 по итогам структурного выравнивания капсида AAV5 и капсида-шаблона имеем попарное структурное соответствие между их аминокислотными остатками. В одном из случаев решение о замене исходной аминокислоты на соответствующую аминокислоту капсида-шаблона принимается на основе анализа микроокружения и для исходной аминокислоты, и для ее структурного аналога. В частности, положительное решение о замене принимается, если в паре соответствующих аминокислот в капсиде-шаблоне расположена аминокислота с полярным боковым заместителем, а в AAV5 – с неполярным, при этом обе аминокислоты имеют хотя бы один полярный контакт с соседней пентамерной субъединицей капсида. Считаем, что произвольная аминокислота имеет полярный контакт, если на расстоянии не более 5 Å от любого атома бокового заместителя отличного от водорода расположен хотя бы один атом полярной группы бокового заместителя другой аминокислоты другого капсомера (таблица 3). По аналогии с Примером 2 замены на цистеин и метионин также не допускаются.

Таблица 3. Перечень аминокислот с полярными боковыми заместителями и атомы их полярных групп (наименование по спецификации PDB) за исключением атомов водорода.

Аминокислота	Атомы, входящие в полярную боковую группу (название по спецификации PDB)
Arg	NH1, NH2, CZ, NE
Asn	CG, OD1, ND2,
Asp	CG, OD1, OD2
Cys	SG
Gln	CD, OE1, NE2
Glu	CD, OE1, OE2
His	ND1, CD2, CE1, NE2
Lys	NZ
Ser	OG
Thr	OG1

Тур	ОН
-----	----

Результаты применения описываемого способа дизайна мутаций в капсиде AAV5 с использованием трёх капсидов-шаблонов: HBoV1 (PDBid 5urf), B19 (PDBid 1s58), BPV (4qc8) приведены в таблице 4. В первой колонке указаны аминокислоты из интерфейса взаимодействия соседних пентамерных субъединиц капсида AAV5, для которых найдены подходящие варианты замены в одном из трёх капсидов HBoV1, B19 и BPV. В остальных колонках приведены аминокислоты, полученные по итогам попарного структурного выравнивания AAV5 на каждый из капсидов. Звездочкой отмечены аминокислоты, пригодные для замены в соответствии с критерием увеличения числа полярных контактов и запретом замены на цистеин и метионин.

Таблица 4. Позиции капсомера AAV5, для которых выявлены подходящие замены и соответствующие им аминокислоты капсидов HBoV1, B19 и BPV. Звёздочкой отмечены аминокислоты, пригодные для замены в соответствии с критерием увеличения числа полярных контактов между капсомерами.

AAV5	B19	HBoV1	BPV
431V	Y*	V	V
616A	D*	K	R
683W	R*	W	W

Пример 4. Дизайн мутаций по принципу уменьшения числа полярных контактов между капсомерами

В соответствие с Примером 1 по итогам структурного выравнивания капсида AAV5 и капсида-шаблона имеем попарное структурное соответствие между их аминокислотными остатками. В одном из случаев решение о замене исходной аминокислоты на соответствующую аминокислоту капсида-шаблона принимается на основе анализа микроокружения и для исходной аминокислоты, и для ее структурного аналога. В частности, положительное решение о замене принимается, если в паре соответствующих аминокислот в капсиде AAV5 находится остаток полярной аминокислоты, образующий хотя бы один полярный контакт с соседней пентамерной субъединицей, в то время как в капсиде-шаблоне расположен остаток неполярной аминокислоты. При этом по аналогии с Примером 2 в качестве замены не рассматриваются остатки цистеина или метионина.

Результаты применения описываемого способа дизайна мутаций в капсиде AAV5 с использованием трёх капсидов-шаблонов: HBoV1 (PDBid 5urf), B19 (PDBid 1s58), BPV (4qc8) приведены в таблице 5. В первой колонке указаны аминокислоты из интерфейса взаимодействия соседних пентамерных субъединиц капсида AAV5, для которых найдены

подходящие варианты замены в одном из трёх капсидов HBoV1, B19 и BPV. В остальных колонках приведены аминокислоты, полученные по итогам попарного структурного выравнивания AAV5 на каждый из капсидов-шаблонов. Звездочкой отмечены аминокислоты, пригодные для замены в соответствии с критерием увеличения числа полярных контактов и запретом замены на цистеин и метионин.

Таблица 5. Позиции капсомера AAV5, для которых выявлены подходящие замены и соответствующие им аминокислоты капсидов HBoV1, B19 и BPV. Звездочкой отмечены аминокислоты, пригодные для замены в соответствии с критерием уменьшения числа полярных контактов между капсомерами.

AAV5	B19	HBoV1	BPV
S222	A*	S	T
R285	L*	Q	N
Q340	K	A*	R
S420	Q	Y	F*
K425	E	L*	M
N679	K	A*	G
S680	A*	T	T
T721	V*	N	H

Пример 5.

Выбор вариантов мутаций в капсиде AAV9 на основе структурного сходства капсидов семейства парвовирусов

Дизайн мутаций капсида AAV9 основан на высокой степени структурного сходства белков капсида внутри семейства парвовирусов (Parvoviridae), в том числе вирусов, не относящихся к AAV. Подбор замены состоит из трёх этапов и включает в себя:

- 1) определение аминокислот белка-капсомера AAV9, расположенных в области интерфейса взаимодействия соседних пентамерных субъединиц капсида;
- 2) структурное выравнивание модифицируемого капсида AAV9 с капсидом одного из парвовирусов, не являющихся AAV (далее “капсид-шаблон”);
- 3) попарное сравнение остатков аминокислот капсида AAV9 и капсида-шаблона.

Предварительно проводится подготовка структур трехмерных моделей AAV9 и капсида-шаблона, которая заключается в достраивании отсутствующих атомов в структуре с помощью утилиты Prepwizard из пакета Schrodinger Suite.

В пункте 1 под интерфейсом взаимодействия понимается набор фрагментов полипептидной цепи белка-капсомера, взаимодействующих с аминокислотами соседней

пентамерной субъединицы, где под пентамерной субъединицей понимается структурный элемент капсида в форме правильного пятиугольника, состоящий из 5 белков-капсомеров, расположенных вокруг центральной поры (L. M. Drouin and M. Agbandje-McKenna. Adeno-associated virus structural biology as a tool in vector development. *Future Virol.*, vol. 8, no. 12, pp. 1183–1199, 2013.).

На втором этапе проводится структурное выравнивание капсида AAV9 и капсида-шаблона с помощью утилиты Strucutre Alignment пакета Schrodinger Suite. По итогам выравнивания для каждой аминокислоты AAV9 из интерфейса взаимодействия соседних пентамерных субъединиц определяется ближайшая к ней аминокислота капсида-шаблона (структурный аналог исходной аминокислоты), которая рассматривается в качестве потенциальной замены. Структурный аналог исходной аминокислоты отсутствует, если в окрестности ближайшей к ней аминокислоты капсида-шаблона расположена другая аминокислота AAV9, расстояние до которой меньше, чем до исходной аминокислоты. Здесь подразумевается, что расстояние между аминокислотами оценивается по расстоянию между альфа-атомами углерода.

После того, как для всех аминокислот интерфейса взаимодействия соседних пентамерных субъединиц определены структурные аналоги, решение о замене принимается в соответствии с Примерами 6, 7 и 8.

Пример 6. Дизайн мутаций по принципу увеличения объема остатка аминокислоты

По итогам структурного выравнивания капсида AAV9 и капсида-шаблона имеем попарное структурное соответствие между их аминокислотными остатками. В одном из случаев решение о замене исходной аминокислоты на соответствующую аминокислоту капсида-шаблона принимается по итогам сравнения объемов Ван-дер-Ваальса боковых заместителей аминокислот (N. J. Darby, S. S. N. J. Darby, and T. E. Creighton, *Protein Structure*. IRL Press at Oxford University Press, 1993; таблица 1). Мутация вносится при соблюдении следующих условий:

1. Объем бокового заместителя аминокислоты из капсида-шаблона больше, чем объем бокового заместителя исходной аминокислоты
2. Аминокислота из капсида шаблона не является цистеином или метионином.

Исключение цистеина и метионина из числа аминокислот для потенциальной замены обусловлено их значительной реакционной способностью, в частности способностью к окислению.

Результаты применения описываемого способа дизайна мутаций в капсиде AAV9 с использованием трёх капсидов-шаблонов: HBoV1 (PDBid 5urf), B19 (PDBid 1s58), BPV (PDBid 4qc8) приведены в таблице 6. В первой колонке указаны аминокислоты из

интерфейса взаимодействия соседних пентамерных субъединиц капсида AAV9, в остальных колонках приведены аминокислоты, полученные по итогам попарного структурного выравнивания AAV9 на каждый из капсидов HBoV1, B19 и BPV. Звездочкой отмечены аминокислоты, пригодные для замены в соответствии с критерием размера бокового заместителя и запретом замены на цистеин и метионин.

Под интерфейсом взаимодействия для данной субъединицы мы понимаем все аминокислоты, хотя бы один атом которых находится на расстоянии, не превышающем 5 Å от какого-либо атома из соседних пентамерных субъединиц.

Для AAV9 расчет был сделан по структуре PDB ID: 3UX1.

В ней, согласно расчету, к интерфейсу взаимодействия между соседними пентамерными субъединицами AAV9 относятся следующие диапазоны остатков белка VP1 капсида AAV9: 230 – 236, 294 – 304, 350 – 353, 394 – 401, 421 – 444, 476 – 480, 601 – 609, 622 – 637, 689 – 697, 733 – 736.

Таблица 6. Аминокислоты из интерфейса взаимодействия соседних пентамерных субъединиц капсида AAV9 и структурно соответствующие им аминокислоты капсомеров B19, HBoV1 и BPV. Звездочкой отмечены аминокислоты, боковой заместитель которых больше, чем у исходной аминокислоты капсомера AAV9. Прочерком отмечен факт отсутствия структурно аналогичной аминокислоты в капсиде шаблона.

AAV9	B19	HBoV1	BPV
C230	E*	G	G
D231	G	G	G
S232	A	T*	S
Q233	T	I*	H*
W234	F	F	F
L235	S	S	S
G236	A*	E*	D*
S294	S	S	S
P295	P	P	P
R296	L	N	Q
D297	E*	D	D
W298	F	W	W
Q299	Q	Q	Q
R300	H	H	R
L301	L	L	L

WO 2023/022631

PCT/RU2022/050255

I302	I	V	T
N303	E*	N	N
N304	N	D*	E*
Y350	Y	H	H
Q351	K*	R*	A
L352	Y*	Y*	Y*
P353	P	P	P
F394	F	L	F
Y395	Y	Y	F
C396	V*	M	L*
L397	L	L	L
E398	E	E	E
Y399	H	N	N
F400	S	S	S
P401	S	D*	D*
P421	P	E*	E*
F422	P	W*	W*
H423	E	I*	V
S424	N*	E*	N*
S425	L*	N*	N*
Y426	E	N	E
A427	G	I*	R*
H428	C	T	A
S429	Q*	F*	Y*
Q430	H*	S	I*
S431	F*	M	P*
L432	-	P	P
D433	Y*	Q*	G
R434	E	M	L
L435	M	M	M
M436	Y*	Y*	F*
N437	N	N	N
P438	P	P	P
L439	Y*	L	K*

WO 2023/022631

PCT/RU2022/050255

I440	G	V	V
D441	S	R*	P
Q442	R*	S	T
Y443	-	R*	R*
L444	-	R*	R*
R476	Q	S	T
N477	N	N	S
Y478	F	W*	W*
I479	M	M	M
P480	P	S	T*
I601	L	M	M
L602	M	L	F*
P603	V*	P	P
G604	G	N*	N*
M605	S	Q	Q
V606	V	M	V
W607	W	W	W
Q608	N	D	D
D609	R*	S	R*
I622	I	V	K*
P623	P	P	P
H624	N	R*	R*
T625	L*	V*	A
D626	D	N	D
G627	D*	R*	K*
N628	S	K*	H*
F629	F	T	T
H630	K*	L*	I*
P631	T*	L*	M
S632	Q*	D*	D*
P633	A	T*	-
L634	A	Q	P
M635	L	D	D
G636	G	G	G

G637	G	S*	S*
K689	P	K	R*
E690	R*	R*	Y*
N691	K*	G	A
S692	A	T*	T*
K693	T	K	K
R694	G	N	N
W695	R	W	W
N696	N	R*	R*
P697	P	P	P
T733	V*	H*	N
R734	H	K	K
N735	L*	V*	V*
L736	-	L	L

Пример 7. Дизайн мутаций по принципу увеличения числа полярных контактов между капсомерами.

В соответствие с Примером 5 по итогам структурного выравнивания капсида AAV9 и капсида-шаблона имеем попарное структурное соответствие между их аминокислотными остатками. В одном из случаев решение о замене исходной аминокислоты на соответствующую аминокислоту капсида-шаблона принимается на основе анализа микроокружения и для исходной аминокислоты, и для ее структурного аналога. В частности, положительное решение о замене принимается, если в паре соответствующих аминокислот в капсиде-шаблоне расположена аминокислота с полярным боковым заместителем, а в AAV9 – с неполярным, при этом обе аминокислоты имеют хотя бы один полярный контакт с соседней пентамерной субъединицей капсида. Считаем, что произвольная аминокислота имеет полярный контакт, если на расстоянии не более 5 Å от любого атома бокового заместителя отличного от водорода расположен хотя бы один атом полярной группы бокового заместителя другой аминокислоты другого капсомера (таблица 3). По аналогии с Примером 6 замены на цистеин и метионин также не допускаются.

Результаты применения описываемого способа дизайна мутаций в капсиде AAV9 с использованием трёх капсидов-шаблонов: HBoV1 (PDBid 5urf), B19 (PDBid 1s58), BPV (4qc8) приведены в таблице 7. В первой колонке указаны аминокислоты из интерфейса взаимодействия соседних пентамерных субъединиц капсида AAV9, для которых найдены

подходящие варианты замены в одном из трёх капсидов HBoV1, B19 и BPV. В остальных колонках приведены аминокислоты, полученные по итогам попарного структурного выравнивания AAV9 на каждый из капсидов. Звездочкой отмечены аминокислоты, пригодные для замены в соответствии с критерием увеличения числа полярных контактов и запретом замены на цистеин и метионин.

Таблица 7. Позиции капсомера AAV9, для которых выявлены подходящие замены и соответствующие им аминокислоты капсидов HBoV1, B19 и BPV. Звездочкой отмечены аминокислоты, пригодные для замены в соответствии с критерием увеличения числа полярных контактов между капсомерами.

AAV9	B19	HBoV1	BPV
A427	G	R*	I
L439	Y*	K*	L
M635	L	D*	D
W695	R*	W	W

Пример 8. Дизайн мутаций по принципу уменьшения числа полярных контактов между капсомерами

В соответствии с Примером 5 по итогам структурного выравнивания капсида AAV9 и капсида-шаблона имеем попарное структурное соответствие между их аминокислотными остатками. В одном из случаев решение о замене исходной аминокислоты на соответствующую аминокислоту капсида-шаблона принимается на основе анализа микроокружения и для исходной аминокислоты, и для ее структурного аналога. В частности, положительное решение о замене принимается, если в паре соответствующих аминокислот в капсиде AAV9 находится остаток полярной аминокислоты, образующий хотя бы один полярный контакт с соседней пентамерной субъединицей, в то время как в капсиде-шаблоне расположен остаток неполярной аминокислоты. При этом по аналогии с Примером 6 в качестве замены не рассматриваются остатки цистеина или метионина.

Результаты применения описываемого способа дизайна мутаций в капсиде AAV9 с использованием трёх капсидов-шаблонов: HBoV1 (PDBid 5urf), B19 (PDBid 1s58), BPV (4qc8) приведены в таблице 8. В первой колонке указаны аминокислоты из интерфейса взаимодействия соседних пентамерных субъединиц капсида AAV9, для которых найдены подходящие варианты замены в одном из трёх капсидов HBoV1, B19 и BPV. В остальных колонках приведены аминокислоты, полученные по итогам попарного структурного выравнивания AAV9 на каждый из капсидов-шаблонов. Звездочкой отмечены

аминокислоты, пригодные для замены в соответствии с критерием увеличения числа полярных контактов и запретом замены на цистеин и метионин.

Таблица 8. Позиции капсомера AAV9, для которых выявлены подходящие замены и соответствующие им аминокислоты капсидов HBoV1, B19 и BPV. Звёздочкой отмечены аминокислоты, пригодные для замены в соответствии с критерием уменьшения числа полярных контактов между капсомерами.

AAV9	B19	HBoV1	BPV
R296	L*	Q	N
Q351	K	A*	R
Y395	Y	F*	Y
S429	Q	Y	F*
S431	F*	P	M
R434	E	L*	M
T625	L*	A*	V*
N691	K	A*	G
S692	A*	T	T
T733	V*	N	H
N735	L*	V*	V*

Пример 9. Получение библиотек вариантов капсидов AAV5

Получение библиотек вариантов капсидов AAV5 производили методом случайного мутагенеза последовательности гена Cap (Davidsson M. et al., 2016). Вкратце, последовательность дикого типа гена Cap пятого серотипа (GenBank ID AF085716.1) была собрана *de novo*, после чего синтезированный геном капсида AAV5 дикого типа фрагментировали с использованием урацил-ДНК-гликозилазы, полученные фрагменты собирали в полноразмерный ген Cap с помощью ДНК-полимеразы, не обладающей корректирующей активностью (в результате в последовательности возникали случайные мутации). Полноразмерные мутантные варианты клонировали в плазмиду-носитель pAAV-linker (Фигура 1) по сайтам рестрикции AscI/EcoRI в общую рамку считывания с зеленым флуоресцентным белком (GFP), продуцируя многообразную случайную библиотеку капсидов AAV5, которую затем использовали для отбора вариантов капсидов с повышенной трансдуцирующей активностью.

Положительный отбор вирусных частиц с повышенной трансдуцирующей активностью проводили *in vitro* на клетках линии CHO-K1-S. При этом для трансдукции использовали частицы, очищенные с помощью УЦФ в градиенте йодиксанола. Спустя 48

часов клетки собирали и выделяли геномную ДНК для последующей амплификации последовательностей геномов вирусов, способных к эффективной трансдукции. Полученные последовательности затем переклонировали и повторно нарабатывали для последующих итераций отбора с целью обогащения библиотеки вариантами с наибольшей эффективностью трансдукции. После 5 раундов отбора капсидные гены 30 клонов просеквенировали для определения наиболее успешных мутаций и их сочетаний. По результатам секвенирования преобладающими сочетаниями мутаций оказались S2A, T711S в VP1 AAV5 и варианты капсидов содержащие S2A, T711S, S651A в VP1 AAV5 – порядка 20% клонов. Также были отобраны варианты капсидов, содержащие мутацию S651A в VP1 AAV5. Данные варианты капсидов клонировали в вектора для наработки вирусных частиц и в дальнейшем использовали для визуализации и сравнения профилей трансдукции относительно AAV5 дикого типа.

Пример 10. Нарботка и последующий отбор рекомбинантных вирусных частиц из полученной библиотеки последовательностей

Для наработки и последующего отбора рекомбинантных вирусных частиц из полученной библиотеки последовательностей была разработана серия плазмид: плазмид-носитель, плазида, содержащая последовательность гена Rep, а также конструкция, содержащая аденовирусные гены, необходимые для репликации вирусных частиц.

Плазида-носитель pAAV-linker (Фигура 1), предназначенная для клонирования библиотек случайных вариантов гена капсида AAV пятого серотипа в одну рамку считывания с репортерным белком, была получена путем замены последовательности модифицированного зеленого флуоресцентного белка в исходной конструкции pAAV-GFP, с помощью рестриктазно-лигазного метода клонирования по сайтам HindIII/EcoRI, на последовательность T2A-GFP, синтезированную *de novo* с добавлением сайтов рестрикции EcoRI с 5'-конца и HindIII с 3'-конца.

Плазида pAAV-Rep, содержащая последовательность гена Rep (Фигура 2), полученную путем клонирования *de novo* синтезированной последовательности гена Rep AAV второго серотипа (GenBank ID AF043303.1) с добавлением сайта рестрикции PciI на 5' конец и сайта рестрикции PsiI на 3' конце, в плазмиду pGem-T Easy (Promega, США) также обработанную рестриктазами PciI/PsiI (New England Biolabs, США).

В качестве источника аденовирусных генов для наработки рекомбинантных вирусных частиц была использована конструкция pHelper (Фигура 3), содержащая AmpR – ген бета-лактамазы, обеспечивающий устойчивость к ампициллину, Ori- ориджин репликации в бактериях, Adeno E2A – последовательность гена хелперного аденовируса,

участвующая в репликации вирусной ДНК, Adeno E4 - последовательность гена хелперного аденовируса, участвующая в репликации вирусной ДНК, Adeno VARNA - последовательность гена хелперного аденовируса отвечающая за стимуляцию трансляции как ранних, так и поздних вирусных генов.

Пример 11. Получение мутантных вариантов капсидов AAV5 и AAV9

Последовательности генов капсида дикого типа AAV пятого серотипа (GenBank ID AF085716.1) и капсида дикого типа AAV девятого серотипа (GenBank ID AY530579.1) были синтезированы *de novo* с включением сайта SmaI с 5' конца и сайта NotI с 3' конца в каждую из синтезированных последовательностей соответственно, после обработки эндонуклеазами рестрикции SmaI/NotI (New England Biolabs, США) каждая из последовательностей была клонирована в плазмидный вектор pAAV-Rep (Фигура 2) так же предварительно обработанный рестриктазами SmaI/NotI (New England Biolabs, США), в результате чего были получены плазмиды: pAAV-RC5 (Фигура 4), содержащая последовательность капсида AAV пятого серотипа дикого типа, а также содержащая последовательность гена Rep AAV, и pAAV-RC9 (Фигура 5), содержащая последовательность капсида AAV девятого серотипа дикого типа, а также содержащая последовательность гена Rep AAV.

Внесение мутаций в последовательность капсида AAV дикого типа производили с использованием коммерческого набора QuikChange II Site-directed mutagenesis kit (Agilent, USA) согласно инструкции производителя. Праймеры для ПЦР были разработаны с помощью программы QuikChange Primer Design (Agilent, USA) (Таблица 9, таблица 10). Вкратце, процедуру, основанную на сайт-направленном мутагенезе, проводили с использованием в качестве матрицы плазмиды pAAV-RC5 или pAAV-RC9 соответственно. Для внесения мутаций, на первом этапе проводили реакцию ПЦР в отдельных пробирках для каждого мутанта и контрольного образца с добавлением соответствующих олигонуклеотидов. На втором этапе проводили обработку рестриктазой DpnI согласно протоколу производителя для удаления матричной плазмидной ДНК, полученной смесью трансформировали компетентные клетки *E.coli XL-1Blue*. Полученные клоны анализировали с использованием ПЦР на специфичные участки целевой плазмиды, отобранные мутанты подвергались секвенированию перед использованием.

Таблица 9. Нуклеотидные последовательности праймеров используемые для сайт-направленного мутагенеза последовательности гена капсида AAV пятого серотипа.

Замена	Прямая последовательность	Обратная последовательность
G226A	cgattccacgtggatggccgacagatcgctcacc	ggtagcactctgtcggccatccacgtggaatcg
D286E	ccactggagcccccagagtggaagactcatcaac	gttgatgagtccttgccactctcgggggctccagtgg
L341Y	ggacgacgactaccagtagccctacgtcgtcggc	gccgacgacgtagggtactggtagtcgtcgtcc

C387V	cgagaggagcagcttctcgtcctagactttccagc	gctgggaaagtactctaggacgaagaagctgctcctc
Q421H	cagcttcgctcccagtcacaacctctcaagctgg	ccagcttgaagaggttgtagtgggagcgaagctg
P466T	ctacaaaaactgggtcaccgggcccattgggcgaac	gttcggcccatgggcccgtgaaccagttttgtag
S594Q	caggaaatcgtgcccggccaggtgtggatggagaggac	gtcctctccatccacacctggccgggcacgatttctg
T614L	gccaagatcccagagctcggggcgacactttcac	gtgaaagtgcgccccgagctctgggatcttggc
N679K	gagatggagtgaggagctcaagaaggaaaagtccaagaggtggaacc	ggttcacactcttgacctttcttcttgagctccactccatctc
P723V	ctatcggaacccgataccttaccgagtgcttaaccca	catgaatgggttaaagcactcgggtaaggtatcgggttc
V431Y	gctggccaacccgctgtacgaccagtagtctgtacc	ggtacaagtactggctgtacagcgggttgccagc
A616D	gatccagagacgggggaccactttcacccctctc	gagaggggtgaaagtgtcccccgtctctgggatc
W683R	gaaaactccaagaggagaaacccagagatccagtag	gtactggatctctgggtttctcctcttgagatttc
S222A	gagattggcattgcatgcccagtggtggggacag	ctgtcccccacccagtggtcatcgcaatgccaatctc
R285L	cagccactggagcccctggactggcaagactcatc	gatgagctcttgccagtcagggggctccagtggtctg
Q340A	cggacgacgactacgacctgacctacgtcgtcg	cgacgacgtagggcagggcgtagtcgtcgtccg
S420F	ctccagcttcgctccctccagaacctcttcaagc	gcttgaagaggttctggaaggagcgaagctggag
S680A	gctcaagaaggaaaacgccaagaggtggaaccag	ctgggtccacctcttgccgtttctctctgagc
T721V	ggaacccgatacctgtgacaccccttaaccattc	gaatgggttaaagggtcgacaaaggtatcgggttc

Кодоны, несущие замену, выделены жирным шрифтом.

Аналогичным способом мутации были внесены в лидерный вариант капсида AAV пятого серотипа одновременно содержащий мутации S2A и T711S, полученный способом направленной эволюции описанном в Примерах 9 и 10.

Таблица 10. Нуклеотидные последовательности праймеров используемые для сайт-направленного мутагенеза последовательности гена капсида AAV девятого серотипа.

Замена	Прямая последовательность	Обратная последовательность
Q351K	cttcacggactcagactataagctcccgtacgtgctc	gagcacgtacgggagcttatagtctgagtcctgaag
Q351R	cttcacggactcagactatagactcccgtacgtgctc	gagcacgtacgggagcttatagtctgagtcctgaag
S232T	gaaattggcattgcatgataccaatggctgggggacag	ctgtccccagccattgggtatcgcaatgccaatttc
D297E	ccacttctcaccacgtgagtggcagcagctcatcac	gttgatgagtcgctgccactcacgtggtgagaagtgg
S692T	gctgcagaaggaaaacactaagcgctggaaccg	cgggttccagcgttagtggtttctctctgcagc
D433Y	ctcacagccaaagcctgtatcgactaatgaatccac	gtggattcattagtcgatacaggctttggctgtgag
T625L	gccaataatctcacctggacggcaactttcacc	ggtgaaagtgtccgtccaggtgaggaaattttggc
T625V	ggccaataatctcacgttgacggcaactttcac	gtgaaagtgtccgtcaacgtgaggaaattttggcc
N691A	gagctgcagaagggaagccagcaagcgctggaacc	ggttccagcgttgctggcttctctgcagctc
C396V	gtcgttcgtccttttacgtgctggaatatttccgctc	gacgggaaatattccagcacgtaaaaggacgaacgac
Y478F	ctgtccagggaagaacttcatactggaccagc	gctgggtccaggtatgaagtcttctcctggacag
R296L	ctgccacttctcaccactgactggcagcagctc	gagtcgctgccagtcagtgtgagaaagtggcag
T733V	gcaccagatacctgggtccgtaatctgtaacgtac	gtacgttacagattacggaccaggtatctggtgc

A427R	cttccatagcagctacagacacagccaaagcctg gac	gtccaggcttggctgtgtctgtagctgctatggaaag
M635D	cacccttctccgctggatggagggttggaaatg	cattccaaaccctccatccagcggagaagggtg
L444R	cactcatcgaccaatacagatactatctctcaaag	cttgagagatagtagtctgtattggctgatgagtg
G604N	ccaaggaatactccgaatatggttggcaggac	gtcctgccaaccatattcggaagtattccttg
G627K	caaaattcctcacacggacaagaacttccacccttct c	gagaagggtgaaagtctgtccgtgtgaggattttg
W695R	ggaaaacagcaagcgcagaaacccggagatcca gtac	gtactggatctccgggttctgcgcttgcgtgtttcc
Q351A	cacggactcagactatgctctcccgtacgtgctcg	cgagcacgtacgggagagcatagctgagtcctg
Y395F	gtgggtcgttcgtctttttctgcctggaatatttcc	ggaaatattccaggcagaaaaaggacgaacgaccac
R434L	cagccaaagcctggacctgctaataatccactca tc	gatgagtggttcattagcaggtccaggcttggctg

Кодоны, несущие замену, выделены жирным шрифтом.

Пример 11. Эффективность наработки векторов на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 5 серотипа (rAAV5)

Для получения частиц rAAV с модифицированным капсидом 5 серотипа, клетки-продуценты HEK293 трансфецировали с использованием полиэтиленимина (PEI, linear, MW 25000, Polysciences, Inc.) одновременно 3 плазмидами:

1) Плазмидой, содержащей нуклеотидные последовательности аденовируса, кодирующие белки и РНК, необходимые для сборки частиц rAAV (хелперная плазида);

2) Плазмидой, содержащей нуклеотидную природную последовательность гена Rep аденоассоциированного вируса, а также последовательность модифицированного гена Cap, которую выбирают из группы: нуклеотидная последовательность SEQ ID NO: 7, 13, 19, 25, 31, 37, 43, 49, 55, 61, 67, 73, 79, 85, 91, 97, 103, 109, 115, 121, 127, 133, 139, 145, 151, 157, 163, 169, 175, 181, 187, 193, 199, 205, 211, 217, 223, 229, 235 или любая другая нуклеотидная последовательность, кодирующая белок VP1 с аминокислотными последовательностями SEQ ID No: 8, 14, 20, 26, 32, 38, 44, 50, 56, 62, 68, 74, 80, 86, 92, 98, 104, 110, 116, 122, 128, 134, 140, 146, 152, 158, 164, 170, 176, 182, 188, 194, 200, 206, 212, 218, 224, 230 или 236 и белки VP2 и VP3 с альтернативных рамок считывания используемой нуклеотидной последовательности, где

VP2 может иметь любую из аминокислотных последовательностей SEQ ID No: 10, 16, 22, 28, 34, 40, 46, 52, 58, 64, 70, 76, 82, 88, 94, 100, 106, 112, 118, 124, 130, 136, 142, 148, 154, 160, 166, 172, 178, 184, 190, 196, 202, 208, 214, 220, 226, 232 или 238;

а VP3 может иметь любую из аминокислотных последовательностей SEQ ID No: 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 54, 60, 66, 72, 78, 84, 90, 96, 102, 108, 114, 120, 126, 132, 138, 144, 150, 156, 162, 168, 174, 180, 186, 192, 198, 204, 210, 216, 222, 228, 234 или 240;

3) Плазмидой, содержащей гетерологичный геном частицы гAAV, кодирующий целевой ген, предназначенный для доставки в клетки пациента.

Данный набор генов обеспечивает сборку вирусных частиц гAAV и инкапсидирование в них целевого генома в течение 72 часов. Через 72 часа после трансфекции клетки-продуценты подвергали лизису (TAKARA BIO INC, Japan) с высвобождением частиц гAAV, полученные вектора обрабатывали ДНКазой I (Invitrogen, USA) в течение 2 часов при 37 ° C, затем еще 2 часа протеиназой K (Invitrogen, USA) при 56 ° C. Титр полученных частиц гAAV проверяли с помощью количественной ПЦР (TaqMan, Applied Biosystems, USA) с использованием сета олигонуклеотидов состоящего из прямого праймера 5'-ACCACATGAAGCAGCACGAC -3', обратного праймера 5'-TCAGCTCGATGCGGTTTCAC -3', и зонда 5'-HEX-CATGCCCCGAAGGCTACGTCCAG-BHQ1 -3' специфичного к последовательности GFP.

Авторами изобретения было неожиданно установлено, что наличие одной или нескольких мутаций, которые выбраны из группы G226A, D286E, L341Y, C387V, Q421H, P466T, S594Q, T614L, N679K, P723V, V431Y, A616D, W683R, S222A, R285L, Q340A, S420F, S680A, T721V в белке VP1 капсида гAAV5 дикого типа или в белке VP1 капсида гAAV5, который уже содержит мутации S2A и T711S, приводило к статистически достоверному увеличению эффективности упаковки трансгена векторами на основе гAAV с указанными выше мутациями. К примеру, при помощи метода количественной ПЦР удалось выявить изменение количества копий упакованного гетерологичного генома частицы гAAV, кодирующего целевой ген GFP (Фигура 6, Фигура 7).

При одновременном наличии мутаций S2A и T711S (AAV5-01Mut-GFP) количество упакованных вирусных геномов, увеличивалось в 7,1 раза с 2,51E+09 вг/мл до 1,78E+10 вг/мл по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut-GFP).

При одновременном наличии мутаций S2A, G226A и T711S (AAV5-02Mut-GFP) количество упакованных вирусных геномов, увеличивалось в 5,4 раза с 2,51E+09 вг/мл до 1,36E+10 вг/мл по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut-GFP).

При одновременном наличии мутаций S2A, D286E и T711S (AAV5-03Mut-GFP) количество упакованных вирусных геномов, увеличивалось в 3,5 раза с 2,51E+09 вг/мл до 8,79E+09 вг/мл по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut-GFP).

При одновременном наличии мутаций S2A, L341Y и T711S (AAV5-04Mut-GFP) количество упакованных вирусных геномов, увеличивалось в 5,8 раза с 2,51E+09 вг/мл до

1,46E+10 вг/мл по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut-GFP).

При одновременном наличии мутаций S2A, C387V и T711S (AAV5-05Mut-GFP) количество упакованных вирусных геномов, увеличивалось в 4,8 раза с 2,51E+09 вг/мл до 1,21E+10 вг/мл по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut-GFP).

При одновременном наличии мутаций S2A, Q421H и T711S (AAV5-06Mut-GFP) количество упакованных вирусных геномов, увеличивалось в 2,1 раза с 2,51E+09 вг/мл до 5,27E+09 вг/мл по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut-GFP).

При одновременном наличии мутаций S2A, P466T и T711S (AAV5-07Mut-GFP) количество упакованных вирусных геномов, увеличивалось в 6,2 раза с 2,51E+09 вг/мл до 1,56E+10 вг/мл по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut-GFP).

При одновременном наличии мутаций S2A, S594Q и T711S (AAV5-08Mut-GFP) количество упакованных вирусных геномов, увеличивалось в 5,9 раза с 2,51E+09 вг/мл до 1,48E+10 вг/мл по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut-GFP).

При одновременном наличии мутаций S2A, T614L и T711S (AAV5-09Mut-GFP) количество упакованных вирусных геномов, увеличивалось в 6,8 раза с 2,51E+09 вг/мл до 1,71E+10 вг/мл по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut-GFP).

При одновременном наличии мутаций S2A, N679K и T711S (AAV5-10Mut-GFP) количество упакованных вирусных геномов, увеличивалось в 3,3 раза с 2,51E+09 вг/мл до 8,28E+09 вг/мл по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut-GFP).

При одновременном наличии мутаций S2A, P723V и T711S (AAV5-11Mut-GFP) количество упакованных вирусных геномов, увеличивалось в 5,0 раза с 2,51E+09 вг/мл до 1,26E+10 вг/мл по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut-GFP).

При одновременном наличии мутаций S2A, V431Y и T711S (AAV5-12Mut-GFP) количество упакованных вирусных геномов, увеличивалось в 2,4 раза с 2,51E+09 вг/мл до 6,03E+09 вг/мл по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut-GFP).

При одновременном наличии мутаций S2A, A616D и T711S (AAV5-13Mut-GFP) количество упакованных вирусных геномов, увеличивалось в 3,6 раза с $2,51E+09$ вг/мл до $9,04E+09$ вг/мл по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut-GFP).

При одновременном наличии мутаций S2A, W683R и T711S (AAV5-14Mut-GFP) количество упакованных вирусных геномов, увеличивалось в 4,6 раза с $2,51E+09$ вг/мл до $1,15E+10$ вг/мл по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut-GFP).

При одновременном наличии мутаций S2A, S222A и T711S (AAV5-15Mut-GFP) количество упакованных вирусных геномов, увеличивалось в 1,5 раза с $2,51E+09$ вг/мл до $3,77E+09$ вг/мл по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut-GFP).

При одновременном наличии мутаций S2A, R285L и T711S (AAV5-16Mut-GFP) количество упакованных вирусных геномов, увеличивалось в 2,5 раза с $2,51E+09$ вг/мл до $6,28E+09$ вг/мл по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut-GFP).

При одновременном наличии мутаций S2A, Q340A и T711S (AAV5-17Mut-GFP) количество упакованных вирусных геномов, увеличивалось в 1,8 раза с $2,51E+09$ вг/мл до $4,52E+09$ вг/мл по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut-GFP).

При одновременном наличии мутаций S2A, S420F и T711S (AAV5-18Mut-GFP) количество упакованных вирусных геномов, увеличивалось в 4,4 раза с $2,51E+09$ вг/мл до $1,10E+10$ вг/мл по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut-GFP).

При одновременном наличии мутаций S2A, S680A и T711S (AAV5-19Mut-GFP) количество упакованных вирусных геномов, увеличивалось в 3,0 раза с $2,51E+09$ вг/мл до $7,53E+09$ вг/мл по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut-GFP).

При одновременном наличии мутаций S2A, T721V и T711S (AAV5-20Mut-GFP) количество упакованных вирусных геномов, увеличивалось в 5,2 раза с $2,51E+09$ вг/мл до $1,31E+10$ вг/мл по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut-GFP).

При наличии единичной мутации G226A (AAV5-21Mut-GFP) количество упакованных вирусных геномов, увеличивалось в 3,9 раза с $2,74E+09$ вг/мл до $1,07E+10$ вг/мл по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut-GFP).

При наличии единичной мутации D286E (AAV5-22Mut-GFP) количество упакованных вирусных геномов, увеличивалось в 2,4 раза с $2,74E+09$ вг/мл до $6,58E+09$ вг/мл по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut-GFP).

При наличии единичной мутации L341Y (AAV5-23Mut-GFP) количество упакованных вирусных геномов, увеличивалось в 2,7 раза с $2,74E+09$ вг/мл до $7,40E+09$ вг/мл по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut-GFP).

При наличии единичной мутации C387V (AAV5-24Mut-GFP) количество упакованных вирусных геномов, увеличивалось в 4,8 раза с $2,74E+09$ вг/мл до $1,32E+10$ вг/мл по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut-GFP).

При наличии единичной мутации Q421H (AAV5-25Mut-GFP) количество упакованных вирусных геномов, увеличивалось в 3,2 раза с $2,74E+09$ вг/мл до $8,77E+09$ вг/мл по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut-GFP).

При наличии единичной мутации P466T (AAV5-26Mut-GFP) количество упакованных вирусных геномов, увеличивалось в 1,7 раза с $2,74E+09$ вг/мл до $4,66E+09$ вг/мл по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut-GFP).

При наличии единичной мутации S594Q (AAV5-27Mut-GFP) количество упакованных вирусных геномов, увеличивалось в 3,1 раза с $2,74E+09$ вг/мл до $8,50E+09$ вг/мл по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut-GFP).

При наличии единичной мутации T614L (AAV5-28Mut-GFP) количество упакованных вирусных геномов, увеличивалось в 1,5 раза с $2,74E+09$ вг/мл до $4,11E+09$ вг/мл по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut-GFP).

При наличии единичной мутации N679K (AAV5-29Mut-GFP) количество упакованных вирусных геномов, увеличивалось в 2,5 раза с $2,74E+09$ вг/мл до $6,85E+09$ вг/мл по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut-GFP).

При наличии единичной мутации P723V (AAV5-30Mut-GFP) количество упакованных вирусных геномов, увеличивалось в 3,2 раза с $2,74E+09$ вг/мл до $8,77E+09$ вг/мл по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut-GFP).

При наличии единичной мутации V431Y (AAV5-31Mut-GFP) количество упакованных вирусных геномов, увеличивалось в 2,4 раза с $2,74E+09$ вг/мл до $6,58E+09$ вг/мл по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut-GFP).

При наличии единичной мутации A616D (AAV5-32Mut-GFP) количество упакованных вирусных геномов, увеличивалось в 1,6 раза с $2,74E+09$ вг/мл до $4,39E+09$ вг/мл по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut-GFP).

При наличии единичной мутации W683R (AAV5-33Mut-GFP) количество упакованных вирусных геномов, увеличивалось в 1,3 раза с $2,74E+09$ вг/мл до $3,56E+09$ вг/мл по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut-GFP).

При наличии единичной мутации S222A (AAV5-34Mut-GFP) количество упакованных вирусных геномов, увеличивалось в 1,8 раза с $2,74E+09$ вг/мл до $4,93E+09$ вг/мл по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut-GFP).

При наличии единичной мутации R285L (AAV5-35Mut-GFP) количество упакованных вирусных геномов, увеличивалось в 2,1 раза с $2,74E+09$ вг/мл до $5,76E+09$ вг/мл по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut-GFP).

При наличии единичной мутации Q340A (AAV5-36Mut-GFP) количество упакованных вирусных геномов, увеличивалось в 1,4 раза с $2,74E+09$ вг/мл до $3,84E+09$ вг/мл по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut-GFP).

При наличии единичной мутации S420F (AAV5-37Mut-GFP) количество упакованных вирусных геномов, увеличивалось в 3,5 раза с $2,74E+09$ вг/мл до $9,59E+09$ вг/мл по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut-GFP).

При наличии единичной мутации S680A (AAV5-38Mut-GFP) количество упакованных вирусных геномов, увеличивалось в 2,2 раза с $2,74E+09$ вг/мл до $6,03E+09$ вг/мл по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut-GFP).

При наличии единичной мутации T721V (AAV5-39Mut-GFP) количество упакованных вирусных геномов, увеличивалось в 5,1 раза с $2,74E+09$ вг/мл до $1,40E+10$ вг/мл по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut-GFP).

Пример 12. Эффективность наработки векторов на основе модифицированного аденоассоциированного вируса 9 серотипа (rAAV9)

Для получения частиц rAAV с модифицированным капсидом 9 серотипа, клетки-продуценты НЕК293 трансфецировали с использованием полиэтиленимина (PEI, linear, MW 25000, Polysciences, Inc.) одновременно 3 плазмидами:

- 1) Плазмидой, содержащей нуклеотидные последовательности аденовируса, кодирующие белки и РНК, необходимые для сборки частиц rAAV (хелперная плазида);
- 2) Плазмидой, содержащей нуклеотидную природную последовательность гена Rep аденоассоциированного вируса, а также последовательность модифицированного гена Cap, которую выбирают из группы: нуклеотидная последовательность SEQ ID NO: 241, 247, 253, 259, 265, 271, 277, 283, 289, 295, 301, 307, 313, 319, 325, 331, 337, 343, 349, 355, 361 или 367 или любая другая нуклеотидная последовательность, кодирующая белок VP1 с аминокислотными последовательностями SEQ ID No: 242, 248, 254, 260, 266, 272, 278, 284,

290, 296, 302, 308, 314, 320, 326, 332, 338, 344, 350, 356, 362 или 368 и белки VP2 и VP3 с альтернативных рамок считывания используемой нуклеотидной последовательности, где VP2 может иметь любую из аминокислотных последовательностей SEQ ID No: 244, 250, 256, 262, 268, 274, 280, 286, 292, 298, 304, 310, 316, 322, 328, 334, 340, 346, 352, 358, 364 или 370;

а VP3 может иметь любую из аминокислотных последовательностей SEQ ID No: 246, 252, 258, 264, 270, 276, 282, 288, 294, 300, 306, 312, 318, 324, 330, 336, 342, 348, 354, 360, 366 или 372;

3) Плазмидой, содержащей гетерологичный геном частицы гAAV, кодирующий целевой ген, предназначенный для доставки в клетки пациента.

Данный набор генов обеспечивает сборку вирусных частиц гAAV и инкапсидирование в них целевого генома в течение 72 часов. Через 72 часа после трансфекции клетки-продуценты подвергали лизису (TAKARA BIO INC, Japanese) с высвобождением частиц гAAV, полученные вектора обрабатывали ДНКазой I (Invitrogen, USA) в течение 2 часов при 37 ° C, затем еще 2 часа протеиназой K (Invitrogen, USA) при 56 ° C. Титр полученных частиц гAAV проверяли с помощью количественной ПЦР (TaqMan, Applied Biosystems, USA) с использованием сета олигонуклеотидов состоящего из прямого праймера 5'-ACCACATGAAGCAGCACGAC -3', обратного праймера 5'-TCAGCTCGATGCGGTTTAC -3', и зонда 5'-HEX-CATGCCCCGAAGGCTACGTCCAG-BHQ1 -3' специфичного к последовательности GFP.

Авторами изобретения было неожиданно установлено, что наличие одной или нескольких мутаций, которые выбраны из группы S232T, D297E, Q351K, Q351R, C396V, D433Y, L444R, Y478F, G604N, G627K, T625L, T625V, S692T, T733V, A427R, M635D, W695R, R296L, Q351A, Y395F, R434L, N691A в белке VP1 капсида гAAV9 дикого типа, приводило к существенному увеличению эффективности упаковки трансгена векторами на основе гAAV с указанными выше мутациями. К примеру, при помощи метода количественной ПЦР удалось выявить изменение количества копий упакованного гетерологичного генома частицы гAAV, кодирующего целевой ген GFP (Фигура 8).

При наличии мутации S232T (AAV9-01Mut-GFP) количество упакованных вирусных геномов, увеличивалось в 1,9 раза с 6,32E+09 вг/мл до 1,19E+10 вг/мл по сравнению с контрольным AAV9 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV9-NullMut-GFP).

При наличии мутации D297E (AAV9-02Mut-GFP) количество упакованных вирусных геномов, увеличивалось в 3,2 раза с 6,32E+09 вг/мл до 2,03E+10 вг/мл по сравнению с контрольным AAV9 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV9-NullMut-GFP).

При наличии мутации Q351K (AAV9-03Mut-GFP) количество упакованных вирусных геномов, увеличивалось в 1,5 раза с $6,32E+09$ вг/мл до $9,30E+09$ вг/мл по сравнению с контрольным AAV9 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV9-NullMut-GFP).

При наличии мутации Q351R (AAV9-04Mut-GFP) количество упакованных вирусных геномов, увеличивалось в 2,5 раза с $6,32E+09$ вг/мл до $1,60E+10$ вг/мл по сравнению с контрольным AAV9 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV9-NullMut-GFP).

При наличии мутации C396V (AAV9-05Mut-GFP) количество упакованных вирусных геномов, увеличивалось в 1,9 раза с $6,32E+09$ вг/мл до $1,17E+10$ вг/мл по сравнению с контрольным AAV9 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV9-NullMut-GFP).

При наличии мутации D433Y (AAV9-06Mut-GFP) количество упакованных вирусных геномов, увеличивалось в 2,9 раза с $6,32E+09$ вг/мл до $1,85E+10$ вг/мл по сравнению с контрольным AAV9 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV9-NullMut-GFP).

При наличии мутации L444R (AAV9-07Mut-GFP) количество упакованных вирусных геномов, увеличивалось в 1,9 раза с $6,32E+09$ вг/мл до $1,23E+10$ вг/мл по сравнению с контрольным AAV9 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV9-NullMut-GFP).

При наличии мутации Y478F (AAV9-08Mut-GFP) количество упакованных вирусных геномов, увеличивалось в 5,0 раза с $6,32E+09$ вг/мл до $3,14E+10$ вг/мл по сравнению с контрольным AAV9 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV9-NullMut-GFP).

При наличии мутации G604N (AAV9-09Mut-GFP) количество упакованных вирусных геномов, увеличивалось в 2,5 раза с $6,32E+09$ вг/мл до $1,61E+10$ вг/мл по сравнению с контрольным AAV9 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV9-NullMut-GFP).

При наличии мутации G627K (AAV9-10Mut-GFP) количество упакованных вирусных геномов, увеличивалось в 1,8 раза с $6,32E+09$ вг/мл до $1,14E+10$ вг/мл по сравнению с контрольным AAV9 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV9-NullMut-GFP).

При наличии мутации T625L (AAV9-11Mut-GFP) количество упакованных вирусных геномов, увеличивалось в 4,6 раза с $6,32E+09$ вг/мл до $2,91E+10$ вг/мл по сравнению с контрольным AAV9 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV9-NullMut-GFP).

При наличии мутации T625V (AAV9-12Mut-GFP) количество упакованных вирусных геномов, увеличивалось в 5,7 раза с $6,32E+09$ вг/мл до $3,62E+10$ вг/мл по сравнению с контрольным AAV9 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV9-NullMut-GFP).

При наличии мутации S692T (AAV9-13Mut-GFP) количество упакованных вирусных геномов, увеличивалось в 2,1 раза с $6,32E+09$ вг/мл до $1,32E+10$ вг/мл по сравнению с контрольным AAV9 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV9-NullMut-GFP).

При наличии мутации T733V (AAV9-14Mut-GFP) количество упакованных вирусных геномов, увеличивалось в 3,0 раза с $6,32E+09$ вг/мл до $1,89E+10$ вг/мл по сравнению с контрольным AAV9 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV9-NullMut-GFP).

При наличии мутации A427R (AAV9-15Mut-GFP) количество упакованных вирусных геномов, увеличивалось в 1,6 раза с $6,32E+09$ вг/мл до $9,86E+09$ вг/мл по сравнению с контрольным AAV9 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV9-NullMut-GFP).

При наличии мутации M635D (AAV9-16Mut-GFP) количество упакованных вирусных геномов, увеличивалось в 1,9 раза с $6,32E+09$ вг/мл до $1,21E+10$ вг/мл по сравнению с контрольным AAV9 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV9-NullMut-GFP).

При наличии мутации W695R (AAV9-17Mut-GFP) количество упакованных вирусных геномов, увеличивалось в 1,5 раза с $6,32E+09$ вг/мл до $9,41E+09$ вг/мл по сравнению с контрольным AAV9 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV9-NullMut-GFP).

При наличии мутации R296L (AAV9-18Mut-GFP) количество упакованных вирусных геномов, увеличивалось в 3,0 раза с $6,32E+09$ вг/мл до $1,93E+10$ вг/мл по сравнению с контрольным AAV9 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV9-NullMut-GFP).

При наличии мутации Q351A (AAV9-19Mut-GFP) количество упакованных вирусных геномов, увеличивалось в 2,0 раза с $6,32E+09$ вг/мл до $1,29E+10$ вг/мл по сравнению с контрольным AAV9 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV9-NullMut-GFP).

При наличии мутации Y395F (AAV9-20Mut-GFP) количество упакованных вирусных геномов, увеличивалось в 4,6 раза с $6,32E+09$ вг/мл до $2,91E+10$ вг/мл по сравнению с контрольным AAV9 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV9-NullMut-GFP).

При наличии мутации R434L (AAV9-21Mut-GFP) количество упакованных вирусных геномов, увеличивалось в 4,0 раза с $6,32E+09$ вг/мл до $2,50E+10$ вг/мл по сравнению с контрольным AAV9 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV9-NullMut-GFP).

При наличии мутации N691A (AAV9-22Mut-GFP) количество упакованных вирусных геномов, увеличивалось в 4,5 раза с $6,32E+09$ вг/мл до $2,85E+10$ вг/мл по сравнению с контрольным AAV9 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV9-NullMut-GFP).

Пример 13. Увеличение эффективности трансдукции клеток препаратами на основе гAAV5, содержащими точечные мутации в белке VP1 капсида гAAV5 дикого типа или в белке VP1 капсида гAAV5, который уже содержит мутации S2A и T711S.

Дизайн эксперимента:

В лунки 12-луночных планшетов были посеяны клетки линии SK-Нер1. Посев проводили в ростовую среду: EMEM с глутамином, 10% сыворотки крупного рогатого скота. Плотность посадки клеток составила $10\,000$ клеток/см². При постановке трансдукции подготовленные заранее клетки были трансдуцированы при MOI 1250 вг/клетка. Все

образцы были поставлены в трипликатах. Для негативного контроля были использованы интактные клетки.

Анализ эффективности трансдукции проводили по интенсивности сигнала репортерного белка GFP с помощью проточного цитометра Guava EasyCyte и программного обеспечения GuavaSoft.

Авторами изобретения было неожиданно установлено, что наличие одной или нескольких мутаций, которые выбраны из группы G226A, D286E, L341Y, C387V, Q421H, P466T, S594Q, T614L, N679K, P723V, V431Y, A616D, W683R, S222A, R285L, Q340A, S420F, S680A, T721V в белке VP1 капсида гAAV5 дикого типа или в белке VP1 капсида гAAV5, который уже содержит мутации S2A и T711S, приводило к статистически значимому увеличению эффективности доставки трансгена векторами на основе гAAV с указанными выше мутациями. К примеру, при помощи метода проточной цитометрии удалось выявить изменение количества GFP позитивных клеток спустя 48 часов после трансдукции линии SK-Нер1 препаратами на основе гAAV с белком VP1 капсида AAV5 дикого типа или белком VP1 капсида AAV5 дикого типа, несущим одну или несколько мутаций, которые выбраны из группы: G226A, D286E, L341Y, C387V, Q421H, P466T, S594Q, T614L, N679K, P723V, V431Y, A616D, W683R, S222A, R285L, Q340A, S420F, S680A, T721V в белке VP1 капсида гAAV5 дикого типа или в белке VP1 капсида гAAV5, который уже содержит мутации S2A и T711S (Фигура 9, Фигура 10).

При одновременном наличии мутаций S2A и T711S (AAV5-01Mut-GFP) количество клеток, экспрессировавших GFP, увеличивалось в 2,16 раза с 20,11% до 43,44% по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut-GFP).

При одновременном наличии мутаций S2A, G226A и T711S (AAV5-02Mut-GFP) количество клеток, экспрессировавших GFP, увеличивалось в 2,02 раза с 20,11% до 40,69% по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut-GFP).

При одновременном наличии мутаций S2A, D286E и T711S (AAV5-03Mut-GFP) количество клеток, экспрессировавших GFP, увеличивалось в 1,90 раза с 20,11% до 38,17% по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut-GFP).

При одновременном наличии мутаций S2A, L341Y и T711S (AAV5-04Mut-GFP) количество клеток, экспрессировавших GFP, увеличивалось в 1,75 раза с 20,11% до 35,27% по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut-GFP).

При одновременном наличии мутаций S2A, C387V и T711S (AAV5-05Mut-GFP) количество клеток, экспрессировавших GFP, увеличивалось в 2,10 раза с 20,11% до 42,22% по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut-GFP).

При одновременном наличии мутаций S2A, Q421H и T711S (AAV5-06Mut-GFP) количество клеток, экспрессировавших GFP, увеличивалось в 1,64 раза с 20,11% до 32,97% по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut-GFP).

При одновременном наличии мутаций S2A, P466T и T711S (AAV5-07Mut-GFP) количество клеток, экспрессировавших GFP, увеличивалось в 1,41 раза с 20,11% до 28,35% по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut-GFP).

При одновременном наличии мутаций S2A, S594Q и T711S (AAV5-08Mut-GFP) количество клеток, экспрессировавших GFP, увеличивалось в 2,08 раза с 20,11% до 41,82% по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut-GFP).

При одновременном наличии мутаций S2A, T614L и T711S (AAV5-09Mut-GFP) количество клеток, экспрессировавших GFP, увеличивалось в 2,36 раза с 20,11% до 47,50% по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut-GFP).

При одновременном наличии мутаций S2A, N679K и T711S (AAV5-10Mut-GFP) количество клеток, экспрессировавших GFP, увеличивалось в 1,67 раза с 20,11% до 33,55% по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut-GFP).

При одновременном наличии мутаций S2A, P723V и T711S (AAV5-11Mut-GFP) количество клеток, экспрессировавших GFP, увеличивалось в 1,87 раза с 20,11% до 37,60% по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut-GFP).

При одновременном наличии мутаций S2A, V431Y и T711S (AAV5-12Mut-GFP) количество клеток, экспрессировавших GFP, увеличивалось в 1,27 раза с 20,11% до 25,54% по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut-GFP).

При одновременном наличии мутаций S2A, A616D и T711S (AAV5-13Mut-GFP) количество клеток, экспрессировавших GFP, увеличивалось в 2,12 раза с 20,11% до 42,63%

по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut-GFP).

При одновременном наличии мутаций S2A, W683R и T711S (AAV5-14Mut-GFP) количество клеток, экспрессировавших GFP, увеличивалось в 1,26 раза с 20,11% до 25,33% по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut-GFP).

При одновременном наличии мутаций S2A, S222A и T711S (AAV5-15Mut-GFP) количество клеток, экспрессировавших GFP, увеличивалось в 1,57 раза с 20,11% до 31,57% по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut-GFP).

При одновременном наличии мутаций S2A, R285L и T711S (AAV5-16Mut-GFP) количество клеток, экспрессировавших GFP, увеличивалось в 1,38 раза с 20,11% до 27,75% по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut-GFP).

При одновременном наличии мутаций S2A, Q340A и T711S (AAV5-17Mut-GFP) количество клеток, экспрессировавших GFP, увеличивалось в 1,45 раза с 20,11% до 29,15% по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut-GFP).

При одновременном наличии мутаций S2A, S420F и T711S (AAV5-18Mut-GFP) количество клеток, экспрессировавших GFP, увеличивалось в 1,57 раза с 20,11% до 31,57% по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut-GFP).

При одновременном наличии мутаций S2A, S680A и T711S (AAV5-19Mut-GFP) количество клеток, экспрессировавших GFP, увеличивалось в 1,68 раза с 20,11% до 33,78% по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut-GFP).

При одновременном наличии мутаций S2A, T721V и T711S (AAV5-20Mut-GFP) количество клеток, экспрессировавших GFP, увеличивалось в 2,01 раза с 20,11% до 40,41% по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut-GFP).

При наличии единичной мутации G226A (AAV5-21Mut-GFP) количество клеток, экспрессировавших GFP, увеличивалось в 1,29 раза с 20,11% до 34,10% по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut-GFP).

При наличии единичной мутации D286E (AAV5-22Mut-GFP) количество клеток, экспрессировавших GFP, увеличивалось в 1,27 раза с 20,11% до 33,57% по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut-GFP).

При наличии единичной мутации L341Y (AAV5-23Mut-GFP) количество клеток, экспрессировавших GFP, увеличивалось в 1,41 раза с 20,11% до 37,08% по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut-GFP).

При наличии единичной мутации C387V (AAV5-24Mut-GFP) количество клеток, экспрессировавших GFP, увеличивалось в 1,85 раза с 20,11% до 48,62% по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut-GFP).

При наличии единичной мутации Q421H (AAV5-25Mut-GFP) количество клеток, экспрессировавших GFP, увеличивалось в 1,52 раза с 20,11% до 40,05% по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut-GFP).

При наличии единичной мутации P466T (AAV5-26Mut-GFP) количество клеток, экспрессировавших GFP, увеличивалось в 1,33 раза с 20,11% до 34,94% по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut-GFP).

При наличии единичной мутации S594Q (AAV5-27Mut-GFP) количество клеток, экспрессировавших GFP, увеличивалось в 1,60 раза с 20,11% до 42,26% по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut-GFP).

При наличии единичной мутации T614L (AAV5-28Mut-GFP) количество клеток, экспрессировавших GFP, увеличивалось в 1,26 раза с 20,11% до 33,16% по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut-GFP).

При наличии единичной мутации N679K (AAV5-29Mut-GFP) количество клеток, экспрессировавших GFP, увеличивалось в 1,24 раза с 20,11% до 32,78% по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut-GFP).

При наличии единичной мутации P723V (AAV5-30Mut-GFP) количество клеток, экспрессировавших GFP, увеличивалось в 1,58 раза с 20,11% до 41,67% по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut-GFP).

При наличии единичной мутации V431Y (AAV5-31Mut-GFP) количество клеток, экспрессировавших GFP, увеличивалось в 1,27 раза с 20,11% до 33,46% по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut-GFP).

При наличии единичной мутации A616D (AAV5-32Mut-GFP) количество клеток, экспрессировавших GFP, увеличивалось в 1,46 раза с 20,11% до 38,47% по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut-GFP).

При наличии единичной мутации W683R (AAV5-33Mut-GFP) количество клеток, экспрессировавших GFP, увеличивалось в 1,52 раза с 20,11% до 40,05% по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut-GFP).

При наличии единичной мутации S222A (AAV5-34Mut-GFP) количество клеток, экспрессировавших GFP, увеличивалось в 1,34 раза с 20,11% до 35,31% по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut-GFP).

При наличии единичной мутации R285L (AAV5-35Mut-GFP) количество клеток, экспрессировавших GFP, увеличивалось в 1,55 раза с 20,11% до 40,84% по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut-GFP).

При наличии единичной мутации Q340A (AAV5-36Mut-GFP) количество клеток, экспрессировавших GFP, увеличивалось в 1,44 раза с 20,11% до 37,94% по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut-GFP).

При наличии единичной мутации S420F (AAV5-37Mut-GFP) количество клеток, экспрессировавших GFP, увеличивалось в 1,63 раза с 20,11% до 42,95% по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut-GFP).

При наличии единичной мутации S680A (AAV5-38Mut-GFP) количество клеток, экспрессировавших GFP, увеличивалось в 1,71 раза с 20,11% до 45,06% по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut-GFP).

При наличии единичной мутации T721V (AAV5-39Mut-GFP) количество клеток, экспрессировавших GFP, увеличивалось в 2,06 раза с 20,11% до 54,40% по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut-GFP).

Пример 14. Увеличение эффективности трансдукции клеток препаратами на основе гAAV9, содержащими точечные мутации в белке VP1 капсида гAAV9 дикого типа.

Дизайн эксперимента:

В лунки 12-луночных планшетов были посеяны клетки линии HeLa. Посев проводили в ростовую среду: EMEM с глутамином, 10% сыворотки крупного рогатого скота. Плотность посадки клеток составила 10 000 клеток/см². При постановке трансдукции подготовленные заранее клетки были трансдуцированы при MOI 100000 вг/клетка. Все образцы были поставлены в трипликатах. Для негативного контроля были использованы интактные клетки.

Анализ эффективности трансдукции проводили по интенсивности сигнала репортерного белка GFP с помощью проточного цитометра Guava EasyCyte и программного обеспечения GuavaSoft.

Авторами изобретения было неожиданно установлено, что наличие одной или нескольких мутаций, которые выбраны из группы S232T, D297E, Q351K, Q351R, C396V,

D433Y, L444R, Y478F, G604N, G627K, T625L, T625V, S692T, T733V, A427R, M635D, W695R, R296L, Q351A, Y395F, R434L, N691A в белке VP1 капсида гAAV9 дикого типа, приводило к существенному увеличению эффективности доставки трансгена векторами на основе гAAV с указанными выше мутациями. К примеру, при помощи метода проточной цитометрии удалось выявить изменение количества GFP позитивных клеток спустя 48 часов после трансдукции линии HeLa препаратами на основе гAAV с белком VP1 капсида AAV9 дикого типа или белком VP1 капсида AAV9 дикого типа, несущим одну или несколько мутаций, которые выбраны из группы: S232T, D297E, Q351K, Q351R, C396V, D433Y, L444R, Y478F, G604N, G627K, T625L, T625V, S692T, T733V, A427R, M635D, W695R, R296L, Q351A, Y395F, R434L, N691A в белке VP1 капсида гAAV9 дикого (Фигура 11).

При наличии мутации S232T (AAV9-01Mut-GFP) количество клеток, экспрессировавших GFP, увеличивалось в 1,21 раза с 27,53% до 33,31% по сравнению с контрольным AAV9 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV9-NullMut-GFP).

При наличии мутации D297E (AAV9-02Mut-GFP) количество клеток, экспрессировавших GFP, увеличивалось в 1,25 раза с 27,53% до 34,41% по сравнению с контрольным AAV9 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV9-NullMut-GFP).

При наличии мутации Q351K (AAV9-03Mut-GFP) количество клеток, экспрессировавших GFP, увеличивалось в 1,30 раза с 27,53% до 35,87% по сравнению с контрольным AAV9 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV9-NullMut-GFP).

При наличии мутации Q351R (AAV9-04Mut-GFP) количество клеток, экспрессировавших GFP, увеличивалось в 1,16 раза с 27,53% до 31,93% по сравнению с контрольным AAV9 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV9-NullMut-GFP).

При наличии мутации C396V (AAV9-05Mut-GFP) количество клеток, экспрессировавших GFP, увеличивалось в 1,37 раза с 27,53% до 37,74% по сравнению с контрольным AAV9 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV9-NullMut-GFP).

При наличии мутации D433Y (AAV9-06Mut-GFP) количество клеток, экспрессировавших GFP, увеличивалось в 1,10 раза с 27,53% до 30,28% по сравнению с контрольным AAV9 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV9-NullMut-GFP).

При наличии мутации L444R (AAV9-07Mut-GFP) количество клеток, экспрессировавших GFP, увеличивалось в 1,40 раза с 27,53% до 38,45% по сравнению с контрольным AAV9 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV9-NullMut-GFP).

При наличии мутации Y478F (AAV9-08Mut-GFP) количество клеток, экспрессировавших GFP, увеличивалось в 1,56 раза с 27,53% до 42,95% по сравнению с контрольным AAV9 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV9-NullMut-GFP).

При наличии мутации G604N (AAV9-09Mut-GFP) количество клеток, экспрессировавших GFP, увеличивалось в 1,25 раза с 27,53% до 34,32% по сравнению с контрольным AAV9 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV9-NullMut-GFP).

При наличии мутации G627K (AAV9-10Mut-GFP) количество клеток, экспрессировавших GFP, увеличивалось в 1,24 раза с 27,53% до 34,14% по сравнению с контрольным AAV9 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV9-NullMut-GFP).

При наличии мутации T625L (AAV9-11Mut-GFP) количество клеток, экспрессировавших GFP, увеличивалось в 1,45 раза с 27,53% до 39,92% по сравнению с контрольным AAV9 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV9-NullMut-GFP).

При наличии мутации T625V (AAV9-12Mut-GFP) количество клеток, экспрессировавших GFP, увеличивалось в 1,49 раза с 27,53% до 41,02% по сравнению с контрольным AAV9 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV9-NullMut-GFP).

При наличии мутации S692T (AAV9-13Mut-GFP) количество клеток, экспрессировавших GFP, увеличивалось в 1,38 раза с 27,53% до 37,99% по сравнению с контрольным AAV9 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV9-NullMut-GFP).

При наличии мутации T733V (AAV9-14Mut-GFP) количество клеток, экспрессировавших GFP, увеличивалось в 1,44 раза с 27,53% до 39,73% по сравнению с контрольным AAV9 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV9-NullMut-GFP).

При наличии мутации A427R (AAV9-15Mut-GFP) количество клеток, экспрессировавших GFP, увеличивалось в 1,23 раза с 27,53% до 33,86% по сравнению с контрольным AAV9 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV9-NullMut-GFP).

При наличии мутации M635D (AAV9-16Mut-GFP) количество клеток, экспрессировавших GFP, увеличивалось в 1,22 раза с 27,53% до 33,59% по сравнению с контрольным AAV9 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV9-NullMut-GFP).

При наличии мутации W695R (AAV9-17Mut-GFP) количество клеток, экспрессировавших GFP, увеличивалось в 1,47 раза с 27,53% до 40,47% по сравнению с контрольным AAV9 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV9-NullMut-GFP).

При наличии мутации R296L (AAV9-18Mut-GFP) количество клеток, экспрессировавших GFP, увеличивалось в 1,26 раза с 27,53% до 34,69% по сравнению с контрольным AAV9 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV9-NullMut-GFP).

При наличии мутации Q351A (AAV9-19Mut-GFP) количество клеток, экспрессировавших GFP, увеличивалось в 1,35 раза с 27,53% до 37,17% по сравнению с контрольным AAV9 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV9-NullMut-GFP).

При наличии мутации Y395F (AAV9-20Mut-GFP) количество клеток, экспрессировавших GFP, увеличивалось в 1,48 раза с 27,53% до 40,74% по сравнению с контрольным AAV9 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV9-NullMut-GFP).

При наличии мутации R434L (AAV9-21Mut-GFP) количество клеток, экспрессировавших GFP, увеличивалось в 1,67 раза с 27,53% до 45,91% по сравнению с контрольным AAV9 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV9-NullMut-GFP).

При наличии мутации N691A (AAV9-22Mut-GFP) количество клеток, экспрессировавших GFP, увеличивалось в 1,72 раза с 27,53% до 47,47% по сравнению с контрольным AAV9 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV9-NullMut-GFP).

Пример 15. Увеличение продукции целевого белка, кодируемого трансгеном, после трансдукции клеток препаратами на основе гAAV5, содержащими единичные мутации в белке VP1 капсида гAAV5 дикого типа или в белке VP1 капсида гAAV5, который уже содержит мутации S2A и T711S.

Дизайн эксперимента:

В лунки 12-луночных планшетов были посеяны клетки линии SK-Hep1. Посев проводили в ростовую среду: EMEM с глутамином, 10% сыворотки крупного рогатого скота. Плотность посадки клеток составила 10 000 клеток/см². При постановке трансдукции подготовленные заранее клетки были трансдуцированы при MOI 10000 вг/клетка. Все образцы были поставлены в трипликатах. Для негативного контроля были использованы интактные клетки.

Анализ количества белка FIX в культуральной жидкости 7 дней спустя после трансдукции оценивался при помощи набора ИФА Human Factor IX ELISA Kit. Использованное разведение образцов - 1:50. Процедура была проведена согласно инструкции производителя.

Авторами изобретения было неожиданно установлено, что наличие одной или нескольких мутаций, которые выбраны из группы: G226A, D286E, L341Y, C387V, Q421H, P466T, S594Q, T614L, N679K, P723V, V431Y, A616D, W683R, S222A, R285L, Q340A, S420F, S680A, T721V в белке VP1 капсида гAAV5 дикого типа или в белке VP1 капсида гAAV5, который уже содержит мутации S2A и T711S, приводило к существенному увеличению продукции белка FIX после трансдукции клеток линии SK-Hep1 векторами на основе гAAV5 с указанными выше мутациями. К примеру, метод иммуноферментного анализа (ИФА) позволил выявить повышение количества белка FIX в среде культивирования спустя 7 дней после трансдукции клеток линии SK-Hep1 препаратами на основе гAAV с белком VP1 капсида AAV5 дикого типа или белком VP1 капсида AAV5 дикого типа, несущим одну или несколько мутаций, которые выбраны из группы: G226A,

D286E, L341Y, C387V, Q421H, P466T, S594Q, T614L, N679K, P723V, V431Y, A616D, W683R, S222A, R285L, Q340A, S420F, S680A, T721V в белке VP1 капсида rAAV5 дикого типа или в белке VP1 капсида rAAV5, который уже содержит мутации S2A и T711S (Фигура 12, Фигура 13).

При одновременном наличии мутаций S2A, T711S (AAV5-01Mut-FIX) количество продуцируемого белка увеличивалось в 2,76 раза с 628,67 нг/мл до 1736,67 нг/мл по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut- FIX).

При одновременном наличии мутаций S2A, G226A и T711S (AAV5-02Mut-FIX) количество продуцируемого белка увеличивалось в 1,85 раза с 628,67 нг/мл до 1161,83 нг/мл по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut- FIX).

При одновременном наличии мутаций S2A, D286E и T711S (AAV5-03Mut-FIX) количество продуцируемого белка увеличивалось в 1,71 раза с 628,67 нг/мл до 1075,02 нг/мл по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut- FIX).

При одновременном наличии мутаций S2A, L341Y и T711S (AAV5-04Mut-FIX) количество продуцируемого белка увеличивалось в 1,65 раза с 628,67 нг/мл до 1037,30 нг/мл по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut- FIX).

При одновременном наличии мутаций S2A, C387V и T711S (AAV5-05Mut-FIX) количество продуцируемого белка увеличивалось в 2,28 раза с 628,67 нг/мл до 1433,36 нг/мл по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut- FIX).

При одновременном наличии мутаций S2A, Q421H и T711S (AAV5-06Mut-FIX) количество продуцируемого белка увеличивалось в 1,67 раза с 628,67 нг/мл до 1049,87 нг/мл по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut- FIX).

При одновременном наличии мутаций S2A, P466T и T711S (AAV5-07Mut-FIX) количество продуцируемого белка увеличивалось в 1,21 раза с 628,67 нг/мл до 763,33 нг/мл по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut- FIX).

При одновременном наличии мутаций S2A, S594Q и T711S (AAV5-08Mut-FIX) количество продуцируемого белка увеличивалось в 1,26 раза с 628,67 нг/мл до 792,12 нг/мл по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut- FIX).

При одновременном наличии мутаций S2A, T614L и T711S (AAV5-09Mut-FIX) количество продуцируемого белка увеличивалось в 2,17 раза с 628,67 нг/мл до 1362,67 нг/мл по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut- FIX).

При одновременном наличии мутаций S2A, N679K и T711S (AAV5-10Mut-FIX) количество продуцируемого белка увеличивалось в 1,98 раза с 628,67 нг/мл до 1244,76 нг/мл по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut- FIX).

При одновременном наличии мутаций S2A, P723V и T711S (AAV5-11Mut-FIX) количество продуцируемого белка увеличивалось в 1,69 раза с 628,67 нг/мл до 1062,45 нг/мл по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut- FIX).

При одновременном наличии мутаций S2A, V431Y и T711S (AAV5-12Mut-FIX) количество продуцируемого белка увеличивалось в 1,12 раза с 628,67 нг/мл до 704,11 нг/мл по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut- FIX).

При одновременном наличии мутаций S2A, A616D и T711S (AAV5-13Mut-FIX) количество продуцируемого белка увеличивалось в 2,15 раза с 628,67 нг/мл до 1351,63 нг/мл по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut- FIX).

При одновременном наличии мутаций S2A, W683R и T711S (AAV5-14Mut-FIX) количество продуцируемого белка увеличивалось в 1,08 раза с 628,67 нг/мл до 678,96 нг/мл по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut- FIX).

При одновременном наличии мутаций S2A, S222A и T711S (AAV5-15Mut-FIX) количество продуцируемого белка увеличивалось в 1,30 раза с 628,67 нг/мл до 817,27 нг/мл по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut- FIX).

При одновременном наличии мутаций S2A, R285L и T711S (AAV5-16Mut-FIX) количество продуцируемого белка увеличивалось в 1,16 раза с 628,67 нг/мл до 729,25 нг/мл по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut- FIX).

При одновременном наличии мутаций S2A, Q340A и T711S (AAV5-17Mut-FIX) количество продуцируемого белка увеличивалось в 1,36 раза с 628,67 нг/мл до 854,99 нг/мл

по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut-FIX).

При одновременном наличии мутаций S2A, S420F и T711S (AAV5-18Mut-FIX) количество продуцируемого белка увеличивалось в 1,19 раза с 628,67 нг/мл до 745,00 нг/мл по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut-FIX).

При одновременном наличии мутаций S2A, S680A и T711S (AAV5-19Mut-FIX) количество продуцируемого белка увеличивалось в 1,52 раза с 628,67 нг/мл до 955,57 нг/мл по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut-FIX).

При одновременном наличии мутаций S2A, T721V и T711S (AAV5-20Mut-FIX) количество продуцируемого белка увеличивалось в 1,79 раза с 628,67 нг/мл до 1125,00 нг/мл по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut-FIX).

При наличии единичной мутации G226A (AAV5-21Mut-FIX) количество продуцируемого белка увеличивалось в 1,56 раза с 653,19 нг/мл до 1020,59 нг/мл по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut-FIX).

При наличии единичной мутации D286E (AAV5-22Mut-FIX) количество продуцируемого белка увеличивалось в 1,63 раза с 653,19 нг/мл до 1063,78 нг/мл по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut-FIX).

При наличии единичной мутации L341Y (AAV5-23Mut-FIX) количество продуцируемого белка увеличивалось в 1,95 раза с 653,19 нг/мл до 1271,00 нг/мл по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut-FIX).

При наличии единичной мутации C387V (AAV5-24Mut-FIX) количество продуцируемого белка увеличивалось в 1,81 раза с 653,19 нг/мл до 1184,04 нг/мл по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut-FIX).

При наличии единичной мутации Q421H (AAV5-25Mut-FIX) количество продуцируемого белка увеличивалось в 1,92 раза с 653,19 нг/мл до 1254,12 нг/мл по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut-FIX).

При наличии единичной мутации P466T (AAV5-26Mut-FIX) количество продуцируемого белка увеличивалось в 1,73 раза с 653,19 нг/мл до 1130,02 нг/мл по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut-FIX).

При наличии единичной мутации S594Q (AAV5-27Mut-FIX) количество продуцируемого белка увеличивалось в 1,88 раза с 653,19 нг/мл до 1228,00 нг/мл по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut-FIX).

При наличии единичной мутации T614L (AAV5-28Mut-FIX) количество продуцируемого белка увеличивалось в 1,40 раза с 653,19 нг/мл до 915,81 нг/мл по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut- FIX).

При наличии единичной мутации N679K (AAV5-29Mut-FIX) количество продуцируемого белка увеличивалось в 1,21 раза с 653,19 нг/мл до 790,36 нг/мл по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut- FIX).

При наличии единичной мутации P723V (AAV5-30Mut-FIX) количество продуцируемого белка увеличивалось в 1,35 раза с 653,19 нг/мл до 881,81 нг/мл по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut- FIX).

При наличии единичной мутации V431Y (AAV5-31Mut-FIX) количество продуцируемого белка увеличивалось в 1,34 раза с 653,19 нг/мл до 875,27 нг/мл по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut- FIX).

При наличии единичной мутации A616D (AAV5-32Mut-FIX) количество продуцируемого белка увеличивалось в 1,11 раза с 653,19 нг/мл до 727,75 нг/мл по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut- FIX).

При наличии единичной мутации W683R (AAV5-33Mut-FIX) количество продуцируемого белка увеличивалось в 1,57 раза с 653,19 нг/мл до 1025,51 нг/мл по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut- FIX).

При наличии единичной мутации S222A (AAV5-34Mut-FIX) количество продуцируемого белка увеличивалось в 1,78 раза с 653,19 нг/мл до 1162,68 нг/мл по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut- FIX).

При наличии единичной мутации R285L (AAV5-35Mut-FIX) количество продуцируемого белка увеличивалось в 1,47 раза с 653,19 нг/мл до 960,19 нг/мл по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut- FIX).

При наличии единичной мутации Q340A (AAV5-36Mut-FIX) количество продуцируемого белка увеличивалось в 1,64 раза с 653,19 нг/мл до 1071,23 нг/мл по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut- FIX).

При наличии единичной мутации S420F (AAV5-37Mut-FIX) количество продуцируемого белка увеличивалось в 1,24 раза с 653,19 нг/мл до 809,96 нг/мл по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut- FIX).

При наличии единичной мутации S680A (AAV5-38Mut-FIX) количество продуцируемого белка увеличивалось в 1,37 раза с 653,19 нг/мл до 894,87 нг/мл по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut- FIX).

При наличии единичной мутации T721V (AAV5-39Mut-FIX) количество продуцируемого белка увеличивалось в 1,96 раза с 653,19 нг/мл до 1280,25 нг/мл по сравнению с контрольным AAV5 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV5-NullMut- FIX).

Пример 16. Увеличение продукции целевого белка, кодируемого трансгеном, после трансдукции клеток препаратами на основе гAAV9, содержащими мутации в белке VP1 капсида гAAV9 дикого типа.

Дизайн эксперимента:

В лунки 12-луночных планшетов были посеяны клетки линии CHO-K1-S. Посев проводили в ростовую среду: ДМЕМ/F12 с глутамином, содержание глюкозы 4,5 г/л, 5% сыворотки крупного рогатого скота. Плотность посадки клеток составила 10 000 клеток/см². При постановке трансдукции подготовленные заранее клетки были трансдуцированы при MOI 200 000 вг/клетка. Все образцы были поставлены в трипликатах. Для негативного контроля были использованы интактные клетки.

Анализ количества белка FIX в культуральной жидкости 7 дней спустя после трансдукции оценивался при помощи набора ИФА Human Factor IX ELISA Kit. Использованное разведение образцов - 1:25. Процедура была проведена согласно инструкции производителя.

Авторами изобретения было неожиданно установлено, что наличие одной или нескольких мутаций, которые выбраны из группы: группы S232T, D297E, Q351K, Q351R, C396V, D433Y, L444R, Y478F, G604N, G627K, T625L, T625V, S692T, T733V, A427R, M635D, W695R, R296L, Q351A, Y395F, R434L, N691A в белке VP1 капсида гAAV9 дикого типа, приводило к существенному увеличению продукции белка FIX после трансдукции клеток линии CHO-K1-S векторами на основе гAAV с указанными выше мутациями. К примеру, метод иммуноферментного анализа (ИФА) позволил выявить повышение количества белка FIX в среде культивирования спустя 7 дней после трансдукции клеток линии CHO-K1-S препаратами на основе гAAV с белком VP1 капсида AAV9 дикого типа несущим одну или несколько мутаций, которые выбраны из группы: S232T, D297E, Q351K, Q351R, C396V, D433Y, L444R, Y478F, G604N, G627K, T625L, T625V, S692T, T733V, A427R, M635D, W695R, R296L, Q351A, Y395F, R434L, N691A (Фигура 14).

При наличии мутации S232T (AAV9-01Mut- FIX) количество продуцируемого белка увеличивалось в 1,18 раза с 947,5 нг/мл до 1118,05 нг/мл по сравнению с контрольным AAV9 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV9-NullMut- FIX).

При наличии мутации D297E (AAV9-02Mut- FIX) количество продуцируемого белка увеличивалось в 1,20 раза с 947,5 нг/мл до 1137,00 нг/мл по сравнению с контрольным AAV9 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV9-NullMut- FIX).

При наличии мутации Q351K (AAV9-03Mut- FIX) количество продуцируемого белка увеличивалось в 1,26 раза с 947,5 нг/мл до 1195,00 нг/мл по сравнению с контрольным AAV9 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV9-NullMut- FIX).

При наличии мутации Q351R (AAV9-04Mut- FIX) количество продуцируемого белка увеличивалось в 1,22 раза с 947,5 нг/мл до 1157,17 нг/мл по сравнению с контрольным AAV9 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV9-NullMut- FIX).

При наличии мутации C396V (AAV9-05Mut- FIX) количество продуцируемого белка увеличивалось в 1,64 раза с 947,5 нг/мл до 1554,17 нг/мл по сравнению с контрольным AAV9 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV9-NullMut- FIX).

При наличии мутации D433Y (AAV9-06Mut- FIX) количество продуцируемого белка увеличивалось в 1,17 раза с 947,5 нг/мл до 1110,50 нг/мл по сравнению с контрольным AAV9 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV9-NullMut- FIX).

При наличии мутации L444R (AAV9-07Mut- FIX) количество продуцируемого белка увеличивалось в 1,20 раза с 947,5 нг/мл до 1141,50 нг/мл по сравнению с контрольным AAV9 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV9-NullMut- FIX).

При наличии мутации Y478F (AAV9-08Mut- FIX) количество продуцируемого белка увеличивалось в 2,01 раза с 947,5 нг/мл до 1908,50 нг/мл по сравнению с контрольным AAV9 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV9-NullMut- FIX).

При наличии мутации G604N (AAV9-09Mut- FIX) количество продуцируемого белка увеличивалось в 1,26 раза с 947,5 нг/мл до 1197,67 нг/мл по сравнению с контрольным AAV9 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV9-NullMut- FIX).

При наличии мутации G627K (AAV9-10Mut- FIX) количество продуцируемого белка увеличивалось в 1,23 раза с 947,5 нг/мл до 1166,67 нг/мл по сравнению с контрольным AAV9 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV9-NullMut- FIX).

При наличии мутации T625L (AAV9-11Mut- FIX) количество продуцируемого белка увеличивалось в 1,77 раза с 947,5 нг/мл до 1677,50 нг/мл по сравнению с контрольным AAV9 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV9-NullMut- FIX).

При наличии мутации T625V (AAV9-12Mut- FIX) количество продуцируемого белка увеличивалось в 1,83 раза с 947,5 нг/мл до 1736,67 нг/мл по сравнению с контрольным AAV9 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV9-NullMut- FIX).

При наличии мутации S692T (AAV9-13Mut- FIX) количество продуцируемого белка увеличивалось в 1,55 раза с 947,5 нг/мл до 1464,83 нг/мл по сравнению с контрольным AAV9 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV9-NullMut- FIX).

При наличии мутации T733V (AAV9-14Mut- FIX) количество продуцируемого белка увеличивалось в 1,55 раза с 947,5 нг/мл до 1469,50 нг/мл по сравнению с контрольным AAV9 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV9-NullMut- FIX).

При наличии мутации A427R (AAV9-15Mut- FIX) количество продуцируемого белка увеличивалось в 1,65 раза с 947,5 нг/мл до 1563,38 нг/мл по сравнению с контрольным AAV9 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV9-NullMut- FIX).

При наличии мутации M635D (AAV9-16Mut- FIX) количество продуцируемого белка увеличивалось в 1,70 раза с 947,5 нг/мл до 1607,00 нг/мл по сравнению с контрольным AAV9 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV9-NullMut- FIX).

При наличии мутации W695R (AAV9-17Mut- FIX) количество продуцируемого белка увеличивалось в 2,32 раза с 947,5 нг/мл до 2201,67 нг/мл по сравнению с контрольным AAV9 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV9-NullMut- FIX).

При наличии мутации R296L (AAV9-18Mut- FIX) количество продуцируемого белка увеличивалось в 1,23 раза с 947,5 нг/мл до 1161,83 нг/мл по сравнению с контрольным AAV9 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV9-NullMut- FIX).

При наличии мутации Q351A (AAV9-19Mut- FIX) количество продуцируемого белка увеличивалось в 1,48 раза с 947,5 нг/мл до 1402,30 нг/мл по сравнению с контрольным AAV9 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV9-NullMut- FIX).

При наличии мутации Y395F (AAV9-20Mut- FIX) количество продуцируемого белка увеличивалось в 1,21 раза с 947,5 нг/мл до 1145,00 нг/мл по сравнению с контрольным AAV9 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV9-NullMut- FIX).

При наличии мутации R434L (AAV9-21Mut- FIX) количество продуцируемого белка увеличивалось в 1,54 раза с 947,5 нг/мл до 1456,83 нг/мл по сравнению с контрольным AAV9 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV9-NullMut- FIX).

При наличии мутации N691A (AAV9-22Mut- FIX) количество продуцируемого белка увеличивалось в 2,33 раза с 947,5 нг/мл до 2203,33 нг/мл по сравнению с контрольным AAV9 с белком VP1 капсида дикого типа (AAV9-NullMut- FIX).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения модифицированного капсида AAV, который включает:

а) определение аминокислот белка-капсомера модифицируемого AAV, расположенных в области интерфейса взаимодействия соседних пентамерных субъединиц капсида;

б) структурное выравнивание модифицируемого капсида AAV с капсидом-шаблоном для определения попарного соответствия между каждой аминокислотой модифицируемого AAV из области интерфейса взаимодействия между соседними пентамерными субъединицами и ближайшей к ней аминокислотой капсида-шаблона, как структурного аналога исходной аминокислоты, которая рассматривается в качестве потенциальной замены,

где под капсидом-шаблоном понимают схожий по строению капсид вируса, выбранного из семейства парвовирусов (Parvoviridae), который не является AAV;

в) попарное сравнение определенных на стадии б) остатков аминокислот капсида модифицируемого AAV и капсида-шаблона для выявления структурных различий капсида модифицируемого AAV и капсида-шаблона в области интерфейса взаимодействия соседних пентамерных субъединиц капсида;

г) выбор позиций для мутагенеза, при этом аминокислотные остатки для мутагенеза находятся в области интерфейса взаимодействия соседних пентамерных субъединиц капсида модифицируемого AAV и имеют структурное различие между капсидом модифицируемого AAV и капсидом-шаблоном в области интерфейса взаимодействия соседних пентамерных субъединиц капсида;

д) выбор аминокислотного остатка для мутагенеза в позиции, выбранной на стадии г), с использованием одного из следующих принципов:

-замена исходной аминокислоты в белке-капсомере модифицируемого AAV на аминокислоту, которая имеет больший объем, за исключением цистеина и метионина;

-замена исходной аминокислоты в белке-капсомере модифицируемого AAV на аминокислоту, которая имеет увеличенное или уменьшенное число полярных контактов между капсомерами, за исключением цистеина и метионина;

е) введение одной или нескольких аминокислотных замен, выбранных на стадиях г)-д), в области интерфейса взаимодействия соседних пентамерных субъединиц капсида модифицируемого AAV.

2. Способ получения модифицированного капсида AAV по п.1, который дополнительно включает проверку полученных на стадии е) модифицированных капсидов AAV с одной или несколькими аминокислотными заменами на наличие одного или

нескольких улучшенных свойств по сравнению с капсидом AAV без данных модификаций, где одно или несколько улучшенных свойств выбирают из группы:

- увеличение эффективности трансдукции клеток,
- увеличение продукции целевого белка,
- увеличение эффективности наработки за счет высокоэффективной продукции (сборки) инкапсидированных вирусных векторов на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV).

3. Способ получения модифицированного капсида AAV по п.1, который дополнительно включает проверку полученных на стадии е) модифицированных капсидов AAV с одной или несколькими аминокислотными заменами на наличие одного или нескольких улучшенных свойств по сравнению с капсидом AAV без данных модификаций и отбор модифицированных капсидов AAV, которые имеют одно или несколько улучшенных свойств по сравнению с капсидом AAV без данных модификаций, где одно или несколько улучшенных свойств выбирают из группы:

- увеличение эффективности трансдукции клеток,
- увеличение продукции целевого белка,
- увеличение эффективности наработки за счет высокоэффективной продукции (сборки) инкапсидированных вирусных векторов на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV).

4. Способ получения капсида AAV по п.1, где капсид модифицируемого AAV выбирают из группы, включающей: AAV человека, AAV обезьян или AAV птиц.

5. Способ получения капсида AAV по п.1, где капсид модифицируемого AAV выбирают из группы, включающей следующие серотипы AAV: AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV13, AAV14, AAV15 или AAV16.

6. Способ получения капсида AAV по п.1, где схожий по строению капсид-шаблон, выбирают из группы, которая включает: парвовирус B19, человеческий бокавирус 1 (HBoV1), парвовирус крупного рогатого скота (BVP).

7. Модифицированный капсид AAV для получения вирусных векторов на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса, который получен способом, включающим:

- а) определение аминокислот белка-капсомера модифицируемого AAV, расположенных в области интерфейса взаимодействия соседних пентамерных субъединиц капсида;

б) структурное выравнивание модифицируемого капсида AAV с капсидом-шаблоном для определения попарного соответствия между каждой аминокислотой модифицируемого AAV из области интерфейса взаимодействия между соседними пентамерными субъединицами и ближайшей к ней аминокислотой капсида-шаблона, как структурного аналога исходной аминокислоты, которая рассматривается в качестве потенциальной замены,

где под капсидом-шаблоном понимают схожий по строению капсид вируса, выбранного из семейства парвовирусов (Parvoviridae), который не является AAV;

в) попарное сравнение определенных на стадии б) остатков аминокислот капсида AAV и капсида-шаблона для выявления структурных различий капсида модифицируемого AAV и капсида-шаблона в области интерфейса взаимодействия соседних пентамерных субъединиц капсида;

г) выбор позиций для мутагенеза, при этом аминокислотные остатки для мутагенеза находятся в области интерфейса взаимодействия соседних пентамерных субъединиц капсида модифицируемого AAV и имеют структурное различие между капсидом модифицируемого AAV и капсидом-шаблоном в области интерфейса взаимодействия соседних пентамерных субъединиц капсида;

д) выбор аминокислотного остатка для мутагенеза в позиции, выбранной на стадии г), с использованием одного из следующих принципов:

-замена исходной аминокислоты в белке-капсомере модифицируемого AAV на аминокислоту, которая имеет больший объем, за исключением цистеина и метионина;

-замена исходной аминокислоты в белке-капсомере модифицируемого AAV на аминокислоту, которая имеет увеличенное или уменьшенное число полярных контактов между капсомерами, за исключением цистеина и метионина;

е) введение одной или нескольких аминокислотных замен, выбранных на стадиях г)-д), в области интерфейса взаимодействия соседних пентамерных субъединиц капсида модифицируемого AAV;

а также, при необходимости, дополнительно включает

ж) проверку полученных на стадии е) модифицированных капсидов AAV на наличие одного или нескольких улучшенных свойств по сравнению с капсидом AAV без данных модификаций и отбор модифицированных капсидов AAV, которые имеют одно или несколько улучшенных свойств по сравнению с капсидом AAV без данных модификаций, где одно или несколько улучшенных свойств выбирают из группы:

-увеличение эффективности трансдукции клеток,

-увеличение продукции целевого белка,

-увеличение эффективности наработки за счет высокоэффективной продукции (сборки) инкапсидированных вирусных векторов на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV).

8. Модифицированный капсид AAV по п.7, где капсид модифицируемого AAV выбирают из группы, включающей: AAV человека, AAV обезьян или AAV птиц.

9. Модифицированный капсид AAV по п.7, где капсид модифицируемого AAV выбирают из группы, включающей следующие серотипы AAV: AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV13, AAV14, AAV15 или AAV16.

10. Модифицированный капсид AAV для получения вирусных векторов на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса, который включает модифицированный белок VP1 капсида AAV, который имеет аминокислотную последовательность, которую выбирают из группы: SEQ ID No: 14, 20, 26, 32, 38, 44, 50, 56, 62, 68, 74, 80, 86, 92, 98, 104, 110, 116, 122, 128, 134, 140, 146, 152, 158, 164, 170, 176, 182, 188, 194, 200, 206, 212, 218, 224, 230, 236, 242, 248, 254, 260, 266, 272, 278, 284, 290, 296, 302, 308, 314, 320, 326, 332, 338, 344, 350, 356, 362 или 368.

11. Модифицированный капсид AAV по п. 10, который включает:

а) модифицированный белок VP1 капсида AAV, который имеет аминокислотную последовательность, которую выбирают из группы: SEQ ID No: 14, 20, 26, 32, 38, 44, 50, 56, 62, 68, 74, 80, 86, 92, 98, 104, 110, 116, 122, 128, 134, 140, 146, 152, 158, 164, 170, 176, 182, 188, 194, 200, 206, 212, 218, 224, 230, 236, 242, 248, 254, 260, 266, 272, 278, 284, 290, 296, 302, 308, 314, 320, 326, 332, 338, 344, 350, 356, 362 или 368;

б) соответствующий своему белку VP1 модифицированный белок VP2 капсида AAV, который имеет аминокислотную последовательность, которую выбирают из группы: SEQ ID No: 16, 22, 28, 34, 40, 46, 52, 58, 64, 70, 76, 82, 88, 94, 100, 106, 112, 118, 124, 130, 136, 142, 148, 154, 160, 166, 172, 178, 184, 190, 196, 202, 208, 214, 220, 226, 232, 238, 244, 250, 256, 262, 268, 274, 280, 286, 292, 298, 304, 310, 316, 322, 328, 334, 340, 346, 352, 358, 364 или 370;

в) соответствующий своему белку VP1 модифицированный белок VP3 капсида AAV, который имеет аминокислотную последовательность, которую выбирают из группы: SEQ ID No: 18, 24, 30, 36, 42, 48, 54, 60, 66, 72, 78, 84, 90, 96, 102, 108, 114, 120, 126, 132, 138, 144, 150, 156, 162, 168, 174, 180, 186, 192, 198, 204, 210, 216, 222, 228, 234, 240, 246, 252, 258, 264, 270, 276, 282, 288, 294, 300, 306, 312, 318, 324, 330, 336, 342, 348, 354, 360, 366 или 372.

12. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая модифицированный капсид по пп. 7-11.

13. Вектор на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса для доставки субъекту гетерологичной последовательности нуклеиновой кислоты, который включает:

- 1) модифицированный капсид AAV по любому из пп. 7-11, и
- 2) гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую регуляторные последовательности, которые обеспечивают экспрессию продукта, кодируемого гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты, в целевых клетках.

14. Вектор на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса по п. 13, где продукт экспрессии гетерологичной последовательности нуклеиновой кислоты представляет собой терапевтический полипептид или репортерный полипептид.