



**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2019.11.27**

**(21)** Номер заявки  
**201400871**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2013.02.07**

**(51)** Int. Cl. **A61K 35/761** (2015.01)  
**A61K 48/00** (2006.01)

**(54) СПОСОБ ДОСТАВКИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ С РАЗДЕЛЕНИЕМ, ИХ КОМПОЗИЦИИ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ**

**(31)** **61/633,287**

**(32)** **2012.02.07**

**(33)** **US**

**(43)** **2015.04.30**

**(86)** **PCT/US2013/025234**

**(87)** **WO 2013/119880 2013.08.15**

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**ГЛОБАЛ БИО ТЕРАПЕУТИКС, ИНК.**  
**(US)**

**(72)** Изобретатель:  
**Кабрера Акуино Джозе Густаво,**  
**Сегура Пашеко Бланка Анжелика**  
**(MX)**

**(74)** Представитель:  
**Стояченко И.Л. (RU)**

**(56)** **US-A-5328470**  
EASTMAN S.J. ET AL.: "Development of catheter-based procedures for transducing the isolated rabbit liver plasmid DNA", HUMAN GENE THERAPY, MARY ANN LIEBERT, NEW YORK, NY, US, vol. 13, 20 November 2002 (2002-11-20), pages 2065-2077, XP002970584, ISSN: 1043-0342, DOI: 10.1089/10430340260395910, abstract

HODGES ET AL.: "Local Delivery of a Viral Vector Mitigates Neutralization by Antiviral Antibodies and Results in Efficient Transduction of Rabbit Liver", MOLECULAR THERAPY, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, CA, US, vol.

12, no. 6, 1 December 2005 (2005-12-01), pages 1043-1051, XP005176612, ISSN: 1525-0016, DOI: 10.1016/J.YMTHE.2005.06.475, page 1050, left-hand column, paragraph 3, abstract

FABRE J.W. ET AL.: "Hydrodynamic gene delivery to the pig liver via an isolated segment of the inferior vena cava", GENE THERAPY, vol. 15, no. 6, 15 November 2007 (2007-11-15), pages 452-462, XP055058855, ISSN: 0969-7128, DOI: 10.1038/sj.gt.3303079, page 462, left-hand column, paragraph 2 - paragraph 3, abstract

YOSHINO H. ET AL.: "Naked plasmid DNA transfer to the porcine liver using rapid injection with large volume", GENE THERAPY, vol. 13, no. 24, December 2006 (2006-12), pages 1696-1702, XP0055058858, ISSN: 0969-7128, page 1701, left-hand column, paragraph 3 - paragraph 4, abstract

OHASHI KAZUO ET AL.: "Modified infusion procedures affect recombinant adeno-associated virus vector type 2 transduction in the liver", HUMAN GENE THERAPY, vol. 16, no. 3, March 2005 (2005-03), pages 299-306, XP002695090, ISSN: 1043-0342, page 301, left-hand column, paragraph 1 - right-hand column, paragraph 1, abstract

FUJITA SHIGEO ET AL.: "Sendai virus-mediated gene delivery into hepatocytes via isolated hepatic perfusion", BIOLOGICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN, vol. 29, no. 8, August 2006 (2006-08), pages 1728-1734, XP002695085, ISSN: 0918-6158, page 1729, left-hand column, last paragraph - right-hand column, paragraph 2, abstract

**WO-A1-2007019646**

**(57)** Изобретение относится к способу доставки молекул нуклеиновых кислот в компартментализованную ткань или орган субъекта. Также изобретение относится к применению и способам доставки молекулы нуклеиновой кислоты в паренхиму компартментализованной ткани или органа. Способы и применения могут быть использованы в лечении заболеваний и состояний и в промышленных, сельскохозяйственных и ветеринарных применениях. Также в документе раскрыты композиции, содержащие аденовирус или аденоассоциированный вирус, или другой рекомбинантный вирус, составленный в виде композиции для введения в паренхиму ткани или органа.

### **Родственные заявки**

Заявка претендует на приоритет предварительной заявки США № 61/633287, поданной 7 февраля 2012 г., озаглавленной "Способ доставки нуклеиновых кислот с разделением, их композиции и применение".

Эта заявка родственна заявке на патент США номер (номер реестра патентного поверенного 33809.00551.US01/551), поданной в тот же день с этой заявкой, озаглавленной "Способ доставки нуклеиновых кислот с разделением, их композиции и применение", которая претендует на приоритет предварительной заявки США № 61/633287.

В допустимых случаях, предмет каждой из вышеуказанных родственных заявок включен в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

### **Включение посредством ссылки перечня последовательностей, предоставленного в электронном виде**

Электронная версия перечня последовательностей подана с этой заявкой, и его содержание включено в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте. Электронный файл создан 7 февраля 2012 г., имеет размер 3 кбайт и называется 551seqPCL.txt.

### **Область техники**

В настоящем документе предусмотрен способ доставки молекул нуклеиновых кислот в компартиментализованную ткань или орган субъекта. Также в настоящем документе предусмотрены применения и процессы для доставки молекулы нуклеиновой кислоты в паренхиму компартиментализованной ткани или органа. Способы и применения можно использовать для лечения заболеваний и состояний, а также в промышленных, сельскохозяйственных и ветеринарных применениях. Также в настоящем документе предусмотрены композиции, содержащие аденовирус или аденоассоциированный вирус или другой рекомбинантный вирус, созданный для ведения в паренхиму ткани или органа.

### **Предшествующий уровень техники**

Генотерапия представляет собой способ лечения, посредством которого молекулы нуклеиновых кислот вводят субъекту для дополнения или изменения генов у индивидуума. В частности, генотерапия используется в целях лечения заболеваний. Генотерапия рассматривается как имеющая фундаментальное значение для лечения генетических заболеваний, которые развиваются вследствие мутации или делеции гена. Были опробованы различные методики введения субъекту необходимого для терапии гена, кодирующего белок, но существует только несколько примеров, в которых был достигнут удовлетворительный терапевтический эффект. Таким образом, существует необходимость в альтернативных способах введения молекул нуклеиновых кислот субъекту для применения в генотерапии.

### **Сущность изобретения**

В настоящем документе предусмотрен способ доставки молекулы нуклеиновой кислоты субъекту. Способ можно использовать для применения в генотерапии, в том числе для применения для лечения заболеваний и состояний, а также в промышленных, сельскохозяйственных и ветеринарных применениях. Как предусмотрено в настоящем документе, способ включает а) компартиментализацию ткани или органа или части ткани или органа от общей системы кровообращения хозяина и б) введение доставляемого агента непосредственно в паренхиму ткани или органа или части ткани или органа, где доставляемый агент содержит молекулу нуклеиновой кислоты, при этом доставляемый агент проникает в паренхимные клетки компартиментализованной ткани или органа или части ткани или органа. Компартиментализацию ткани или органа, или части ткани или органа можно осуществить до, одновременно или после введения доставляемого агента. Обычно компартиментализацию ткани или органа или части ткани или органа осуществляют перед введением доставляемого агента, и, как правило, не больше чем за 5, 4, 3, 2, 1 мин или 30 с до доставки доставляемого агента, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты.

Предусмотренный в настоящем документе способ может дополнительно включать стадии восстановления связи между тканью, органом или частью ткани или органа и общей системой кровообращения. Стадию восстановления связи обычно осуществляют по прошествии заранее установленного времени после введения доставляемого агента. Заранее установленное время представляет собой период времени, достаточный для проникновения вводимого доставляемого агента в паренхимные клетки (например, путем трансдукции), при котором при восстановлении связи не больше 20% доставляемого агента не проникло в паренхимные клетки. Например, не больше 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6 или 5% доставляемого агента не проникло в паренхимные клетки. В некоторых примерах заранее установленное время представляет собой период времени, достаточный для проникновения вводимого доставляемого агента в паренхимные клетки, при котором при восстановлении связи не больше 20% доставляемого агента выходит в системное кровообращение. Например, не больше 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6 или 5% доставляемого агента попадает в системное кровообращение. Как правило, в способах в настоящем документе заранее установленное время составляет по меньшей мере или по меньшей мере примерно 1, 2, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115 или 120 мин. В конкретных примерах заранее установленное время составляет по меньшей мере или по меньшей мере примерно или составляет или составляет примерно 30 мин и обычно не больше 30-60 мин.

В способах в настоящем документе тканью или органом или частью ткани или органа, которые

компарментализуют, являются печень, головной и спинной мозг, поджелудочная железа, сердце, кожа, почки, легкие, кровеносные сосуды, кости, мышцы, матка, шейка матки, простата, мочеиспускательный канал или кишечник. В конкретных примерах тканью или органом или частью ткани или органа является печень. Например, в примерах способа в настоящем документе, тканью или органом или частью ткани или органа является печень; и заранее установленное время составляет по меньшей мере или составляет по меньшей мере примерно или составляет или составляет примерно 30 мин и обычно больше 30-60 мин. В таких примерах заранее установленное время представляет собой период времени, достаточный для проникновения практически всего доставляемого агента, и обычно по меньшей мере 80% доставляемого агента в гепатоциты паренхимы печени. В примерах способа в настоящем документе часть ткани или органа является компарментализованной. Например, части печени является компарментализованной, и часть представляет собой долю, сегмент или часть доли или сегмента печени. Доля или часть доли может представлять собой правую долю, левую долю, квадратную долю и хвостовую долю или их часть.

В любом из описанных в настоящем документе способов компарментализация ткани или органа или части ткани или органа достигается путем блокирования любой одной или нескольких артерий, вен, протоков и/или сосудов в ткани или органе или части ткани или органа, при этом кровоснабжение и кровоток в ткани или органе или их части уменьшается или устраняется. Обычно компарментализацию осуществляют, когда все артерии, вены, протоки и/или сосуды, обслуживающие или проходящие через ткань или орган, или часть ткани или органа, которые должны быть компарментализованы, заблокированы. Блокирование артерии, вены, протока и/или сосуда можно осуществить с помощью устройства или метода, такого как ручная компрессия, зажим на паренхиму, артериальный или венозный зажим, окклюзионный катетер, сшивающее устройство, бандаж, жгут или кабель. Обычно в способах в настоящем документе ткань или орган или часть ткани или органа компарментализуют путем зажатия с помощью зажима на паренхиму. Зажим может представлять собой лапароскопический зажим. В любом из способов в настоящем документе компарментализация ткани или органа от системного кровообращения также может включать применение отсоса для снижения или устранения крови из ткани или органа или их части.

В любом из способов, предусмотренных в настоящем документе, доставляемый агент может представлять собой невирусный вектор, вирус, вирусоподобную частицу, миникольцо, наночастицу и целую клетку, содержащие молекулу нуклеиновой кислоты. В одном из примеров доставляемый агент представляет собой невирусный вектор, и невирусный вектор представляет собой вектор экспрессии. В другом примере доставляемый агент представляет собой наночастицу, и наночастица является наночастицей направленного действия или радиоактивно меченой наночастицей. В следующем примере доставляемый агент представляет собой вирус. В примерах, в которых доставляемый агент представляет собой вирус, вирус может представлять собой аденовирус, аденоассоциированный вирус (AAV), ретровирус, вирус осповакцины или вирус простого герпеса. Например, вирус может представлять собой ретровирус, который представляет собой лентивирус. Вирус обычно представляет собой рекомбинантный вирус, который содержит молекулу нуклеиновой кислоты, гетерологичную по отношению к его геному. Вирус может представлять собой дефектный по репликации вирус. Вирус может представлять собой вирус, который реплицируется в ядре клетки в субъекте. Вирус также может включать вирусы, которые инфицируют неделящиеся клетки, такие как гепатоциты печени. В некоторых примерах вирус инфицирует неделящиеся клетки. В таких примерах способ может включать стадии стимуляции деления клеток. В конкретных примерах в настоящем документе, в которых печень является органом-мишенью для практического осуществления способа, вирус представляет собой такой вирус, который обладает тропностью по отношению к печени и может проникать в гепатоциты.

Например, в примерах способа, предусмотренного в настоящем документе, вирус представляет собой аденовирус, содержащий гетерологичную нуклеиновую кислоту в своем геноме, который вводят в компарментализованную ткань или орган или часть ткани или органа. Аденовирус может быть любого серотипа, такого как серотип 1 - серотип 51 (например, 1, 2, 4, 5, ..., 51). Например, аденовирус представляет собой аденовирус типа 2 или аденовирус типа 5. Любые аденовирусы, используемые в способах в настоящем документе, включают аденовирусы, которые имеют делецию в любом одном или нескольких кодирующих районах E1, E2a, E2b, E3 или E4. Например, аденовирус содержит делецию в кодирующем районе E1. Как доставляемый агент в способах в настоящем документе, вирус содержит молекулу нуклеиновой кислоты.

В любом из способов в настоящем документе доставляемый агент содержит молекулу нуклеиновой кислоты, которую доставляют субъекту для генотерапии. В некоторых примерах молекула нуклеиновой кислоты кодирует полипептид. Кодированный полипептид может представлять собой терапевтический полипептид. Например, кодируемый полипептид может представлять собой фермент, гормон, фактор коагуляции или свертывания, фактор роста, антитело или его часть, модулятор ангиогенеза, иммуномодулятор, модулятор боли, рецептор, транспортный белок, регуляторный белок, антиген или аллерген. В частности, кодируемый полипептид может представлять собой интерлейкин, интерферон, фактор роста или его часть и рецептор фактора роста или его часть. Примеры молекул нуклеиновых кислот включают, но не ограничиваются молекулами нуклеиновых кислот, которые кодируют аденозиндезаминазу, транс-

мембранный регулятор проводимости при муковисцидозе (CTFR), галсульфазу, ларонидазу, N-ацетилгалактозамин 6-сульфатазу, фенилаланин-аммиак лиазу, кислую альфа-глюкозидазу, имиглюцеразу, алглюкозидазу альфа, тиреотропин, гормон роста, инсулин, тироидный гормон, эритропоэтин (EPO), интерлейкин-1 (IL-1), IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-7, интерферон- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ), IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , фактор некроза опухоли (TNF), IL-12, IL-18, fms-подобную тирозинкиназу 3 (flt3), нейропилин-2 (NP2), костные морфогенетические белки (BMP), эпидермальный фактор роста (EGF), эритропоэтин (EPO), фактор роста фибробластов (FGF), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), фактор роста гепатоцитов (HGF), инсулиноподобный фактор роста (IGF), тромбоцитарный фактор роста (PDGF), трансформирующий фактор роста  $\alpha$  и  $\beta$ , фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), рецептор фактора роста фибробластов (FGFR), антагонист FGFR (sFGFR), рецептор трансформирующего фактора роста (TGFR), рецептор фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR), активатор плазминогена, урокиназу, фактор VIII, фактор IX, фактор фон Виллебранда, гормон роста, металлопротеиназу с тромбоспондиновым мотивом 1 (METH-1), METH-2, фрагменты триптофанил-тРНК синтетазы (TrpRS), белок, родственный пролиферину, фрагмент пролактина, фактор пигментного эпителия (PEDF), вазостатин, ангиостатин, эндостатин, кининостатин, фрагмент фибриногена-E, тромбоспондин, тумстатин, канстатин, рестин, растворимую fms-подобную тирозинкиназу-1 (sFlt-1), растворимые рецепторы фактора роста эндотелия сосудов (sFlk), растворимый нейропилин 1 (sNRP1), индуцируемый интерфероном гамма белок 10 (IP-10), тромбоцитарный фактор 4 (PF-4), Gro-бета, растворимый рецептор эфрина типа B 4 (sEphB4), растворимый эфрин B2, IGF-1, тимидинкиназу вируса простого герпеса (HSV-ТК), карбокси-пептидазу G2 (CPG2), карбоксилэстеразу (CA), цитозиндезаминазу (CD), цитохром P450 (сyt-450), дезоксицитидинкиназу (dCK), нитроредуктазу (NR), пурин-нуклеозид-фосфорилазу (PNP), тимидинфосфорилазу (TP), тимидинкиназу вируса ветряной оспы (VZV-ТК), ксантин-гуанинфосфорибозилтрансферазу (XGPRT), аспартилглюкозаминидазу,  $\alpha$ -галактозидазу А, тиоэстеразу пальмитоилированных белков, трипептидил пептидазу, лизосомный трансмембранный белок, транспортер цистеина, кислую церамидазу, кислую  $\alpha$ -L-фукозидазу, защитный белок/катепсин А, кислую  $\beta$ -глюкозидазу или глюкоцереброзидазу, кислую  $\beta$ -галактозидазу, идуронат-2-сульфатазу,  $\alpha$ -L-идуридазу, галактоцереброзидазу, кислую  $\alpha$ -маннозидазу, кислую  $\beta$ -маннозидазу, арилсульфатазу В, арилсульфатазу А, N-ацетилгалактозамин-6-сульфат сульфатазу, N-ацетилглюкозамин-1-фосфотрансферазу, кислую сфингомиелиназу, болезнь Ниманна-Пика типа С1 (NPC-1),  $\beta$ -гексозаминидазу В, гепаран N-сульфатазу,  $\alpha$ -N-ацетилглюкозаминидазу (NaGlu), ацетил-СоА: $\alpha$ -глюкозаминид N-ацетилтрансферазу, N-ацетилглюкозамин-6-сульфат сульфатазу,  $\beta$ -глюкуронидазу, кислую липазу, неприлизин, деградирующий инсулин фермент инсулизин, тимет олигопептидазу, кальбиндин D28, парвальбумин, фактор, индуцируемый гипоксией, 1-альфа (HIF1-альфа), сиртуин-2 (SIRT-2), белок выживаемости мотонейронов-1 (SMN-1), SMN-2, глиальный нейротрофический фактор (GDNF), цилиарный нейротрофический фактор (CNF), рецептор липопротеина низкой плотности (LDLR), липопротеинлипазу (LPL), альфа-1-антитрипсин (ААТ), УДФ-глюкуронилтрансферазу (UGT), UGT1A1, глюкоза-6-фосфатазу, фосфоенолпируваткарбоксикиназу, галактоза-1 фосфат уридил трансферазу, фенилаланин гидроксилазу, дегидрогеназу разветвленных альфа-кетокислот, фумарилацетоацетат гидролазу, метилмалонил-СоА мутазу, орнитинтранскарбамилазу, синтетазу аргинин-янтарной кислоты, аденозиндезаминазу, гипоксантингуанинфосфорибозилтрансферазу, биотинидазу, бета-глюкоцереброзидазу, бета-глюкуронидазу, порфобилиногендезаминазу (PBDG) или p53.

В других примерах кодируемый полипептид может представлять собой такой полипептид, который применяют в промышленности, ветеринарии или сельском хозяйстве. Например, молекула нуклеиновой кислоты может кодировать полипептид, который увеличивает образование мышц у животного, увеличивает рост волос или шерсти у животного, усиливает рост животного или участвует в синтезе или использовании питательных веществ. В таких примерах кодируемый полипептид может представлять собой ингибитор миостатина, гормон роста, IGF-1, релизинг фактор гормона роста, Ski курицы, серин трансацилазу или о-ацетилсерин сульфгидридазу. Ингибитор миостатина может представлять собой фоллистатин.

В примерах способа, предусмотренного в настоящем документе, молекула нуклеиновой кислоты может представлять собой молекулу ДНК, молекулу РНК и аптамер. Например, молекула нуклеиновой кислоты может представлять собой микроРНК, малую интерферирующую РНК, рибозим и антисмысловую нуклеиновую кислоту. Такие молекулы нуклеиновых кислот также могут оказывать терапевтический эффект в субъекте и, таким образом, могут представлять собой молекулы терапевтических нуклеиновых кислот.

В любом из предусмотренных в настоящем документе способов способ также может необязательно включать стадию визуализации (получения изображений) ткани или органа для идентификации паренхимы перед введением доставляемого агента. Такие способы можно использовать для минимизации введения доставляемого агента и молекулы нуклеиновой кислоты в просвет протока, артерии или сосуда. Например, можно осуществлять получение изображений методом ядерного магнитного резонанса (MRI),

проводить сонографию (ультразвуковую визуализацию) или компьютерную томографию (СТ). В конкретных примерах в практике способов по настоящему документу можно использовать доплеровскую сонографию.

Кроме того, в практике любого из предусмотренных в настоящем документе способов можно использовать способы и реагенты для облегчения или увеличения эффективности доставки доставляемого агента в клетки паренхимы ткани или органа. Например, доставляемый агент может быть смешан с липидами, полимерными реагентами или агентами для облегчения проникновения в паренхимные клетки. Дополнительно или альтернативно, доставляемый агент можно доставлять при использовании физического способа для облегчения проникновения в паренхимные клетки, такого как электропорация, сонопорация, давление, ультразвук или "генная пушка".

В следующих примерах способов по настоящему документу агент, который способствует поглощению клетками доставляемого агента, можно вводить субъекту. Агент можно вводить до, одновременно или после введения доставляемого агента. В некоторых примерах агент представляет собой транскрипционный ингибитор вирус-специфического рецептора клеточной поверхности. Например, агент представляет собой ингибитор гистондеацетилазы (HDAC). Примеры ингибитора HDAC включают, но не ограничиваются ими, трихостатин А, вориностат (SAHA), белиностат (PXD101), LAQ824, панобиностат (LBH589), энтиностат (MS-275), C199, моцетиностат (MGCD0103), ромидепсин (истодакс), вальпроевую кислоту, PCI-24781, SB939, ресминостат, гивиностат, CUDC-101, AR-42, CHR-2845, CHR-3996, 4SC-202, CG200745, кветрин и трихостатин А (TSA).

В практике способов по настоящему документу доставка доставляемого агента в компартментализованную ткань означает, что можно вводить более низкие дозы агента, которые можно далее контролировать, потому что кинетика зависимости между вводимым агентом и экспрессированным белком является линейной. Это отличает заявленный способ от существующих способов генотерапии, в которых агенты преимущественно доставляют внутривенно. Например, количество агента, который вводят способами по настоящему документу, более чем в 100 раз меньше, чем количество того же самого доставляемого агента, вводимого внутривенно. Например, количество доставляемого агента до 200, 500, 1000, 5000, 10000 раз меньше количества того же самого доставляемого агента, вводимого внутривенно.

В конкретных примерах, в которых доставляемый агент представляет собой аденовирус или аденоассоциированный вирус (AAV), содержащий гетерологичную нуклеиновую кислоту в своем геноме, количество вводимого доставляемого агента составляет или составляет примерно между 10 и  $1 \times 10^{12}$  частиц, 10 и  $1 \times 10^6$  частиц,  $1 \times 10^3$  и  $1 \times 10^{12}$  частиц,  $1 \times 10^6$  и  $1 \times 10^{10}$  частиц или  $1 \times 10^7$  и  $1 \times 10^9$  частиц; или составляет или составляет примерно между 10 и  $1 \times 10^{12}$  БОЕ, 10 и  $1 \times 10^6$  БОЕ,  $1 \times 10^3$  и  $1 \times 10^{12}$  БОЕ,  $1 \times 10^6$  и  $1 \times 10^{10}$  БОЕ или  $1 \times 10^7$  и  $1 \times 10^9$  БОЕ. Например, количество вводимого доставляемого агента меньше чем  $1 \times 10^{12}$  частиц,  $1 \times 10^{11}$  частиц,  $1 \times 10^{10}$  частиц,  $1 \times 10^9$  частиц,  $1 \times 10^8$  частиц,  $1 \times 10^7$  частиц,  $1 \times 10^6$  частиц,  $1 \times 10^5$  частиц,  $1 \times 10^4$  частиц,  $1 \times 10^3$  частиц или меньше; или составляет меньше чем  $1 \times 10^{12}$  БОЕ,  $1 \times 10^{11}$  БОЕ,  $1 \times 10^{10}$  БОЕ,  $1 \times 10^9$  БОЕ,  $1 \times 10^8$  БОЕ,  $1 \times 10^7$  БОЕ,  $1 \times 10^6$  БОЕ,  $1 \times 10^5$  БОЕ,  $1 \times 10^4$  БОЕ,  $1 \times 10^3$  БОЕ или меньше.

В примерах любых предусмотренных в настоящем документе способов доставляемый агент можно вводить в более чем один локус в компартментализованной ткани, органе или части ткани или органа. Способы также могут включать стадию удаления из паренхимы ткани или органа или части ткани или органа любого внеклеточного доставляемого агента. Такая стадия может дополнительно снижать или минимизировать попадание доставляемого агента в системное кровообращение, что в противном случае может произойти при снятии компартментализации, если доставляемый агент не проник в клетки. Как правило, стадию удаления осуществляют перед восстановлением связи ткани или органа с общей сосудистой системой. Компартментализацию прекращают путем восстановления связи с общей системой кровообращения по прошествии заранее установленного времени. Стадия восстановления связи с общей системой кровообращения может включать удаление устройства или прекращение применения методики, которые применяли, чтобы блокировать артерии, вены, протоки и/или сосуды. В любом из предусмотренных в настоящем документе способов любые предусмотренные в настоящем документе способы можно повторять множество раз. В некоторых примерах в следующем повторении способа доставляемый агент вводят в тот же компартментализованный локус или в другой компартментализованный локус.

Предусмотренный в настоящем документе способ доставки доставляемого агента, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты, может привести к функциональному действию или экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты в клетках, в которые она доставляется. В некоторых случаях, молекула нуклеиновой кислоты может кодировать белок, который секретируется клетками в ткань, и который в некоторых случаях может достигать или попадать в системное кровообращение. Таким образом, предусмотренные в настоящем документе способы могут использоваться в различных применениях и, в частности, в применениях, в которых желательна локальная или системная экспрессия полипептида. Например, в способах в настоящем документе, доставка молекулы нуклеиновой кислоты обеспечивает продукцию полипептида, при этом доставляемый агент содержит молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид. В практике способов по настоящему документу, экспрессия полипептида продолжается на протяжении по

меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 18, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96 месяцев, 10, 15 лет или дольше после восстановления связи с общей системой кровообращения.

Таким образом, в примерах способа, предусмотренного в настоящем документе, доставка молекулы нуклеиновой кислоты обеспечивает лечение заболевания или состояния. Заболевание или состояние может представлять собой генетически обусловленный дефицит или другое заболевание или состояние, которое вызвано неправильной клеточной или белковой активностью. Заболевание или состояние может представлять собой наследственный дефицит фермента, наследственный иммунодефицит, рак, ретровирусную инфекцию, гемофилию, диабет, мышечную дистрофию, сердечнососудистое расстройство, муковисцидоз, нейродегенеративное расстройство, травму, боль, серповидно-клеточную анемию, аутоиммунное заболевание, воспалительное заболевание или гипертензию. Примеры таких заболеваний или состояний включают, но не ограничиваются ими, гемофилию А и В, сахарный диабет I типа, дефицит альфа-1-антитрипсина (ААТ), гемохроматоз, болезнь Вильсона, синдром Криглера-Найяра I типа, дефицит орнитинтранскарбамилазы, II типа, семейную гиперхолестеринемию, афибриногемиемию, заболевание накопления гликогена (GSD) типа Ia, GSD типа Ib, GSD типа II (Помпе), мукополисахаридоз (MPS I), MPS IIIA, MPS IIIB, MPS VII, болезнь Фабри, болезнь Гоше, синдром Ниманна-Пика, дефицит орнитинтранскарбамилазы (ОТС), фенилкетонурию, фиброз печени, ишемически-реперфузионное повреждение печени, болезнь Альцгеймера, боковой амиотрофический склероз (ALS), галактоземию, фенилкетонурию, заболевание мочи с запахом кленового сиропа, тирозинемию I типа, метилмалоновую ацидемию, цитруллинемию, подагру и синдром Леша-Нихена, синдром Слая, синдром Цельвегера, инфекцию вируса иммунодефицита человека (HIV), тяжелый комбинированный иммунодефицит (SCID), муковисцидоз, острую интермиттирующую порфирию, рассеянный склероз, дефицит липопротеинлипазы (LPLD) или болезнь Паркинсона. В конкретных примерах способа в настоящем документе субъектом является ребенок в возрасте до 18 лет. В некоторых примерах субъектом является плод. Например, субъектом может быть субъект, у которого диагностировали генетически обусловленный дефицит.

В любом из способов, предусмотренных в настоящем документе, способ можно осуществить посредством лапароскопии.

В настоящем документе предусмотрены применения и композиции, содержащие доставляемый агент, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, для применения для непосредственного введения молекулы нуклеиновой кислоты в паренхиму компартиментализованной ткани, органа или части ткани или органа. С помощью применений и композиций для применения для непосредственного введения молекулы нуклеиновой кислоты в паренхиму компартиментализованной ткани, органа или части ткани или органа можно осуществить лечение заболевания или состояния, сверхпродукцию гетерологичного полипептида в субъекте, увеличить образование мышц у животного, увеличить рост волос у животного, увеличить образование шерсти у животного, усилить рост животного или повлиять на синтез или использование питательных веществ у животного.

В применениях и композициях, предусмотренных в настоящем документе для применения для доставки нуклеиновой кислоты в паренхиму компартиментализованной ткани или органа, компартиментализованная ткань или орган, или часть ткани или органа может представлять собой печень, головной и спинной мозг, поджелудочную железу, сердце, кожу, почки, кровеносные сосуды, кости, мышцы, матку, шейку матки, простату, мочеиспускательный канал и кишечник или их часть. В частности, ткань или орган или часть ткани или органа представляет собой печень. Например, применения и композиции для применения, предусмотренные в настоящем документе, могут использоваться для непосредственной доставки нуклеиновой кислоты в паренхиму части печени, которая является компартиментализованной, такой как доля, сегмент или часть доли или сегмента печени. Доля или часть доли может представлять собой правую долю, левую долю, квадратную долю и хвостовую долю или их часть. Компартиментализованная ткань или орган или часть ткани или органа изолирована от системного кровообращения, при этом артерии, вены, протоки и/или сосуды, обслуживающие или проходящие через ткань или орган или часть ткани или органа, заблокированы. Например, ткань или орган или часть ткани или органа компартиментализованы путем изоляции от системного кровообращения с помощью зажима на паренхиму.

В примерах применений и композиций, предусмотренных в настоящем документе для применения для доставки нуклеиновой кислоты в паренхиму компартиментализованной ткани или органа или части ткани или органа, доставляемый агент, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, может представлять собой невирусный вектор, вирус, вирусоподобную частицу, миникольцо, наночастицу и целую клетку, которые содержат молекулу нуклеиновой кислоты. В одном из примеров доставляемый агент представляет собой невирусный вектор, и невирусный вектор представляет собой вектор экспрессии. В другом примере доставляемый агент представляет собой наночастицу, и наночастица является наночастицей направленного действия или радиоактивно меченой наночастицей. В следующем примере доставляемый агент представляет собой вирус. Например, вирус может представлять собой аденовирус, аденоассоциированный вирус (AAV), ретровирус, вирус оспавакцины и вирус простого герпеса. Ретровирус может представлять собой лентивирус. Доставляемый агент обычно представляет собой рекомбинантный вирус, в котором молекула нуклеиновой кислоты является гетерологичной по отношению к его геному. В некоторых примерах вирус представляет собой дефектный по репликации вирус. В других примерах ви-

рус представляет собой такой вирус, который может реплицироваться в ядре клетки. В примерах в настоящем документе вирус представляет собой такой вирус, который может инфицировать неделящиеся клетки, например вирус представляет собой такой вирус, который обладает тропностью по отношению к печени и может проникать в гепатоциты.

В примерах применений и композиций для применения, предусмотренных в настоящем документе, композиция содержит доставляемый агент, который представляет собой аденовирус, содержащий гетерологичную молекулу нуклеиновой кислоты в своем геноме, для применения для доставки в компартиментализованную ткань или орган или часть ткани или органа. Аденовирус может быть любого серотипа, например серотипа 1 - серотипа 51 (например, 1, 2, 3, 4, 5, ..., 51). Например, аденовирус может представлять собой аденовирус типа 2 или аденовирус типа 5. Любой аденовирус для применения в композициях или применениях в настоящем документе включает аденовирусы, которые имеют делецию в любом одном или нескольких кодирующих районах E1, E2a, E2b, E3 или E4. Например, аденовирус содержит делецию в кодирующем районе E1. Как доставляемый агент в композициях и применениях в настоящем документе, вирус содержит молекулу нуклеиновой кислоты, и молекула нуклеиновой кислоты является гетерологичной по отношению к геному вируса.

В любых применениях или композициях, предусмотренных в настоящем документе, композиция содержит доставляемый агент, который содержит молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид. Кодируемый полипептид может представлять собой фермент, гормон, фактор коагуляции или свертывания, фактор роста, антитело или его часть, модулятор ангиогенеза, иммуномодулятор, модулятор боли, рецептор, транспортный белок, регуляторный белок, антиген или аллерген. Например, кодируемый полипептид может представлять собой интерлейкин, интерферон, фактор роста или его часть и рецептор фактора роста или его часть. Примеры молекул нуклеиновых кислот включают, но не ограничиваются молекулами нуклеиновых кислот, которые кодируют аденозиндезаминазу, трансмембранный регулятор проводимости при муковисцидозе (CFTR), галсульфазу, ларонидазу, N-ацетилгалактозамин 6-сульфатазу, фенилаланин-аммиак лиазу, кислую альфа-глюкозидазу, имиглюцеразу, алглюкозидазу альфа, тиреотропин, гормон роста, инсулин, тиреоидный гормон, эритропоэтин (EPO), интерлейкин-1 (IL-1), IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-7, интерферон- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ), IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , фактор некроза опухоли (TNF), IL-12, IL-18, fms-подобную тирозинкиназу 3 (flt3), нейропилин-2 (NP2), костные морфогенетические белки (BMP), эпидермальный фактор роста (EGF), эритропоэтин (EPO), фактор роста фибробластов (FGF), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), фактор роста гепатоцитов (HGF), инсулиноподобный фактор роста (IGF), тромбоцитарный фактор роста (PDGF), трансформирующий фактор роста  $\alpha$  и  $\beta$ , фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), рецептор фактора роста фибробластов (FGFR), антагонист FGFR (sFGFR), рецептор трансформирующего фактора роста (TGFR), рецептор фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR), активатор плазминогена, урокиназу, фактор VIII, фактор IX, фактор фон Виллебранда, гормон роста, металлопротеиназу с тромбоспондиновым мотивом 1 (METH-1), METH-2, фрагменты триптофанил-гРНК синтетазы (TrpRS), белок, родственный пролиферину, фрагмент пролактина, фактор пигментного эпителия (PEDF), вазостатин, ангиостатин, эндостатин, кининостатин, фрагмент фибриногена-E, тромбоспондин, тумстатин, канстатин, рестин, растворимую fms-подобную тирозинкиназу-1 (sFlt-1), растворимые рецепторы фактора роста эндотелия сосудов (sFlk), растворимый нейропилин 1 (sNRP1), индуцируемый интерфероном гамма белок 10 (IP-10), тромбоцитарный фактор 4 (PF-4), G $\alpha$ -бета, растворимый рецептор эфрина типа-B 4 (sEphB4), растворимый эфрин B2, IGF-1, тимидинкиназу вируса простого герпеса (HSV-TK), карбоксипептидазу G2 (CPG2), карбоксилэстеразу (CA), цитозиндезаминазу (CD), цитохром P450 (cyp-450), дезоксицитидинкиназу (dCK), нитроредуктазу (NR), пурин-нуклеозид-фосфорилазу (PNP), тимидинфосфорилазу (TP), тимидинкиназу вируса ветряной оспы (VZV-TK), ксантин-гуанинфосфорибозилтрансферазу (XGPRT), аспартилглюкозаминидазу,  $\alpha$ -галактозидазу A, тиоэстеразу пальмитоилированных белков, трипептидил пептидазу, лизосомный трансмембранный белок, транспортер цистеина, кислую церамидазу, кислую  $\alpha$ -L-фукозидазу, защитный белок/катепсин A, кислую  $\beta$ -глюкозидазу или глюкоцереброзидазу, кислую  $\beta$ -галактозидазу, идуронат-2-сульфатазу,  $\alpha$ -L-идуронидазу, галактоцереброзидазу, кислую  $\alpha$ -маннозидазу, кислую  $\beta$ -маннозидазу, арилсульфатазу B, арилсульфатазу A, N-ацетилгалактозамин-6-сульфат сульфатазу, N-ацетилглюкозамин-1-фосфотрансферазу, кислую сфингомиелиназу, болезнь Ниманна-Пика, тип C1 (NPC-1),  $\beta$ -гексозаминидазу B, гепаран N-сульфатазу,  $\alpha$ -N-ацетилглюкозаминидазу (NaGlu), ацетил-CoA: $\alpha$ -глюкозаминид N-ацетилтрансферазу, N-ацетилглюкозамин-6-сульфат сульфатазу,  $\beta$ -глюкуронидазу, кислую липазу, неприлизин, деградирующий инсулин фермент инсулизин, тимет олигопептидазу, кальбиндин D28, парвальбумин, фактор, индуцируемый гипоксией, 1-альфа (HIF1-альфа), сиртуин-2 (SIRT-2), белок выживаемости мотонейронов-1 (SMN-1), SMN-2, глиальный нейротрофический фактор (GDNF), цилиарный нейротрофический фактор (CNF), рецептор липопротеина низкой плотности (LDLR), липопротеинлипазу (LPL), альфа-1-антитрипсин (AAT), УДФ-глюкуронилтрансферазу (UGT), UGT1A1, глюкоза-6 фосфатазу, фосфоенолпируваткарбоксикиназу, галактоза-1 фосфат уридил трансферазу, фенилаланин гидроксилазу, дегидрогеназу разветвленных альфа-кетокислот, фумарилаце-

тоацетат гидролазу, метилмалонил-CoA мутазу, орнитинтранскарбамилазу, синтетазу аргинин-янтарной кислоты, аденозиндезаминазу, гипоксантингуанинфосфорибозилтрансферазу, биотинидазу, бета-глюкоцереброзидазу, бета-глюкуронидазу, порфобилиногендезаминазу (PBDG) или 53.

В примерах применений или композиций, предусмотренных в настоящем документе, композиция содержит доставляемый агент, который содержит молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид, который увеличивает образование мышц у животного, увеличивает рост волос у животного, увеличивает образование шерсти у животного, усиливает рост животного или участвует в синтезе или использовании питательных веществ. Например, кодируемый полипептид может представлять собой ингибитор миостатина, гормон роста, IGF-1, рилизинг фактор гормона роста, Ski курицы, серин трансацилазу и о-ацетилсерин сульфгидрилазу. В определенных примерах, ингибитор миостатина представляет собой фоллистатин.

В примерах применений или композиций, предусмотренных в настоящем документе, композиция содержит доставляемый агент, который содержит молекулу нуклеиновой кислоты, такую как молекула ДНК, молекула РНК или аптамер. Молекула нуклеиновой кислоты может представлять собой микроРНК, малую интерферирующую РНК, рибозим или антисмысловую нуклеиновую кислоту.

Кроме того, композиции, предусмотренные в настоящем документе для применения, и композиции для применения могут включать агент или реагент, который облегчает или увеличивает эффективность доставки доставляемого агента в клетки паренхимы ткани или органа. Например, доставляемый агент может быть составлен в виде композиции с липидами, полимерными реагентами или другим агентом для облегчения проникновения в паренхимные клетки. В примерах, в которых применение или композиции предусмотрены для доставки в печень, паренхимные клетки могут представлять собой гепатоциты. В других примерах доставляемый агент может быть составлен в виде композиции с агентом, который способствует поглощению клетками доставляемого агента. Например, доставляемый агент может быть составлен в виде композиции с агентом, который представляет собой транскрипционный энхансер вирусспецифического рецептора клеточной поверхности. Примером такого агента является ингибитор гистондеацетилазы (HDAC). Ингибитор HDAC может представлять собой трихостатин А, вориностат (SAHA), белиностат (PXD101), LAQ824, панобиностат (LBH589), энтиностат (MS-275), C199, моцетиностат (MGCD0103), ромидепсин (истодакс), вальпроевую кислоту, PCI-24781, SB939, ресминостат, гивиностат, CUDC-101, AR-42, CHR-2845, CHR-3996, 4SC-202, CG200745, кеветрин или трихостатин А (TSA).

В любом из примеров применений или композиций, предусмотренных в настоящем документе, доставляемый агент в композиции обычно присутствует в количестве, которое более чем в 100 раз меньше количества того же самого доставляемого агента в композиции, составленной для внутривенного введения. Например, количество доставляемого агента в композиции до 200, 500, 1000, 5000, 10000 раз меньше или еще меньше по сравнению с количеством того же самого доставляемого агента в композиции, составленной для внутривенного введения. В конкретных примерах применения или композиции включают доставляемый агент, который представляет собой аденовирус или аденоассоциированный вирус, который содержит гетерологичную молекулу нуклеиновой кислоты в своем геноме, где количество вируса в композиции составляет или составляет примерно от  $2 \times 10^3$  БОЕ/мл до  $1 \times 10^{14}$  БОЕ/мл, от  $2 \times 10^3$  БОЕ/мл до  $1 \times 10^{12}$  БОЕ/мл, от  $2 \times 10^3$  БОЕ/мл до  $2 \times 10^{11}$  БОЕ/мл, от  $1 \times 10^4$  БОЕ/мл до  $5 \times 10^{11}$  БОЕ/мл, от  $1 \times 10^5$  БОЕ/мл до  $1 \times 10^{11}$  БОЕ/мл, от  $2 \times 10^6$  БОЕ/мл до  $2 \times 10^{10}$  БОЕ/мл или от  $1 \times 10^8$  до  $1 \times 10^{10}$  БОЕ/мл; или составляет или составляет примерно между  $2 \times 10^3$  частиц/мл и  $1 \times 10^{14}$  частиц/мл,  $2 \times 10^3$  частиц/мл и  $1 \times 10^{12}$  частиц/мл,  $2 \times 10^3$  частиц/мл и  $2 \times 10^{11}$  частиц/мл,  $1 \times 10^4$  частиц/мл и  $5 \times 10^{11}$  частиц/мл,  $1 \times 10^5$  частиц/мл и  $1 \times 10^{11}$  частиц/мл,  $2 \times 10^6$  частиц/мл и  $2 \times 10^{10}$  частиц/мл или  $1 \times 10^8$  и  $1 \times 10^{10}$  частиц/мл. Композиция может представлять собой жидкую композицию, предусмотренную в объеме, который составляет или составляет примерно между 0,02 и 100 мл, 0,05 и 50 мл, 1 и 10 мл, 0,05 и 5 мл или 0,02 и 1 мл. Предусмотренная в настоящем документе композиция для применения может быть составлена для однократного введения или для многократного введения. Например, композиция может содержать количество аденовируса или аденоассоциированного вируса для однократного введения, где количество аденовируса в композиции составляет или составляет примерно от 10 до  $1 \times 10^{12}$  частиц, от 10 до  $1 \times 10^6$  частиц, от  $1 \times 10^3$  до  $1 \times 10^{12}$  частиц, от  $1 \times 10^6$  до  $1 \times 10^{10}$  частиц или от  $1 \times 10^7$  до  $1 \times 10^9$  частиц; или составляет или составляет примерно от 10 до  $1 \times 10^{12}$  БОЕ, от 10 до  $1 \times 10^6$  БОЕ, от  $1 \times 10^3$  до  $1 \times 10^{12}$  БОЕ, от  $1 \times 10^6$  до  $1 \times 10^{10}$  БОЕ или от  $1 \times 10^7$  до  $1 \times 10^9$  БОЕ. Например, количество аденовируса или аденоассоциированного вируса в композиции меньше чем  $1 \times 10^{12}$  частиц,  $1 \times 10^{11}$  частиц,  $1 \times 10^{10}$  частиц,  $1 \times 10^9$  частиц,  $1 \times 10^8$  частиц,  $1 \times 10^7$  частиц,  $1 \times 10^6$  частиц,  $1 \times 10^5$  частиц,  $1 \times 10^4$  частиц,  $1 \times 10^3$  частиц или меньше; или меньше чем  $1 \times 10^{12}$  БОЕ,  $1 \times 10^{11}$  БОЕ,  $1 \times 10^{10}$  БОЕ,  $1 \times 10^9$  БОЕ,  $1 \times 10^8$  БОЕ,  $1 \times 10^7$  БОЕ,  $1 \times 10^6$  БОЕ,  $1 \times 10^5$  БОЕ,  $1 \times 10^4$  БОЕ,  $1 \times 10^3$  БОЕ или меньше.

В примерах применений или композиций для применения в настоящем документе композиция составлена для введения пациенту человеку. Композиция может быть составлена для введения детям до 18 лет. Композиция может быть составлена для введения плоду.

В примерах применений или композиций для применения в настоящем документе применение доставляемого агента, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты для применения для непосредственного введения в паренхиму компартиментализованной ткани, можно использовать для экспрессии полипептида

в субъекте. Молекула нуклеиновой кислоты может представлять собой молекулу терапевтической нуклеиновой кислоты. Молекула нуклеиновой кислоты может кодировать терапевтический полипептид. Таким образом, применения или композиции для применения в настоящем документе для доставки в паренхиму компартментализованной ткани или органа или их части могут приводить к лечению заболевания или состояния. Примеры таких заболеваний и состояний включают, но не ограничиваются ими, наследственный дефицит фермента, наследственный иммунодефицит, вирусную инфекцию, рак, гемофилию, диабет, мышечную дистрофию, сердечнососудистое расстройство, муковисцидоз, нейродегенеративное расстройство, травму, боль, серповидно-клеточную анемию, аутоиммунное заболевание, воспалительное заболевание или гипертензию. Например, заболевание или состояние может представлять собой гемофилию А и В, сахарный диабет I типа, дефицит альфа-1-антитрипсина (ААТ), гемохроматоз, болезнь Вильсона, синдром Криглера-Найяра I типа, дефицит орнитинтранскарбамилазы II типа, семейную гиперхолестеринемию, афибриногемиию, заболевание накопления гликогена (GSD) типа Ia, GSD типа Ib, GSD типа II (Помпе), мукополисахаридоз (MPS I), MPS IIIA, MPS IIIB, MPS VII, болезнь Фабри, болезнь Гоше, синдром Ниманна-Пика, дефицит орнитинтранскарбамилазы (ОТС), фенилкетонурию, фиброз печени, ишемически-реперфузионное повреждение печени, болезнь Альцгеймера, боковой амиотрофический склероз (ALS), галактоземию, фенилкетонурию, болезнь мочи с запахом кленового сиропа, тирозинемию I типа, метилмалоновую ацидемию, цитруллинемию, подагру и синдром Леша-Нихена, синдром Слая, синдром Цельвегера, инфекцию вируса иммунодефицита человека (HIV), тяжелый комбинированный иммунодефицит (SCID), муковисцидоз, острую интермиттирующую порфирию, рассеянный склероз, дефицит липопротеинлипазы (LPLD) или болезнь Паркинсона.

В настоящем документе предусмотрен контейнер, содержащий композицию аденовируса или аденоассоциированного вируса, составленную для непосредственного введения в паренхиму, в количестве между или примерно между  $10$  и  $1 \times 10^{12}$  БОЕ,  $1 \times 10^3$  БОЕ и  $1 \times 10^{12}$  БОЕ,  $1 \times 10^2$  БОЕ и  $1 \times 10^{10}$  БОЕ,  $1 \times 10^3$  БОЕ и  $1 \times 10^{10}$  БОЕ,  $1 \times 10^3$  БОЕ и  $1 \times 10^9$  БОЕ,  $1 \times 10^3$  БОЕ и  $1 \times 10^8$  БОЕ или  $1 \times 10^6$  БОЕ и  $1 \times 10^9$  БОЕ; или между или примерно между  $10$  и  $1 \times 10^{12}$  частиц,  $1 \times 10^3$  частиц и  $1 \times 10^{12}$  частиц,  $1 \times 10^2$  частиц и  $1 \times 10^{10}$  частиц,  $1 \times 10^3$  частиц и  $1 \times 10^{10}$  частиц,  $1 \times 10^3$  частиц и  $1 \times 10^9$  частиц,  $1 \times 10^3$  частиц и  $1 \times 10^8$  частиц или  $1 \times 10^6$  частиц и  $1 \times 10^9$  частиц. Аденовирус или аденоассоциированный вирус обычно содержит гетерологичную молекулу нуклеиновой кислоты в своем геноме. Контейнером является такой контейнер, который стерилен и герметично запечатан. Контейнер может представлять собой шприц или флакон. Контейнер также может содержать иглу для инъекции композиции. Контейнер также может содержать капиллярное устройство. Например, контейнер может включать капиллярное устройство для проникновения внутрь капсулы Глиссона печени, например, для доставки внутрь паренхимы доставляемого агента.

В конкретных примерах предусмотренных в настоящем документе контейнеров, композиция содержит количество аденовируса или аденоассоциированного вируса, которое меньше чем  $1 \times 10^{12}$  БОЕ, и составляет по меньшей мере или примерно по меньшей мере  $1 \times 10^3$  БОЕ,  $1 \times 10^4$  БОЕ,  $1 \times 10^5$  БОЕ,  $1 \times 10^6$  БОЕ,  $1 \times 10^7$  БОЕ,  $1 \times 10^8$  БОЕ,  $1 \times 10^9$  БОЕ,  $1 \times 10^{10}$  БОЕ,  $1 \times 10^{11}$  БОЕ или больше; или композиция содержит количество аденовируса или аденоассоциированного вируса, которое меньше чем  $1 \times 10^{12}$  частиц, и составляет по меньшей мере или примерно по меньшей мере  $1 \times 10^3$  частиц,  $1 \times 10^4$  частиц,  $1 \times 10^5$  частиц,  $1 \times 10^6$  частиц,  $1 \times 10^7$  частиц,  $1 \times 10^8$  частиц,  $1 \times 10^9$  частиц,  $1 \times 10^{10}$  частиц,  $1 \times 10^{11}$  частиц или больше.

В предусмотренных в настоящем документе примерах, в которых композиция в контейнере содержит аденовирус, аденовирус может быть любого доступного или известного серотипа. Например, аденовирус имеет серотип, который представляет собой серотип 1 - серотип 51 (например, 1, 2, 3, 4, 5, ..., 51). Аденовирус может представлять собой аденовирус типа 2 или аденовирус типа 5. Обычно аденовирус в композициях, предусмотренных в контейнерах в настоящем документе, содержит делецию в любом одном или нескольких кодирующих районах E1, E2a, E2b, E3 или E4. Например, аденовирус содержит делецию в кодирующем районе E1. Гетерологичная молекула нуклеиновой кислоты может быть вставлена или может содержаться в одной или нескольких делетированных областях.

В примерах предусмотренных в настоящем документе контейнеров, композиции содержат доставляемый агент, который содержит молекулу нуклеиновой кислоты. Например, для вирусов, молекулой нуклеиновой кислоты является такая молекула нуклеиновой кислоты, которая гетерологична по отношению к их геномам. В некоторых примерах молекула нуклеиновой кислоты представляет собой любую молекулу нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид. Кодированный полипептид может представлять собой фермент, гормон, фактор коагуляции или свертывания, фактор роста, антитело или его часть, модулятор ангиогенеза, иммуномодулятор, модулятор боли, рецептор, транспортный белок, регуляторный белок, антиген и аллерген. Например, кодируемый полипептид может представлять собой интерлейкин, интерферон, фактор роста или его часть и рецептор фактора роста или его часть. Примеры молекул нуклеиновых кислот в композициях, предусмотренных в контейнерах в настоящем документе, включают, но не ограничиваются молекулами нуклеиновых кислот, которые кодируют аденозиндезаминазу, трансмембранный регулятор проводимости при муковисцидозе (CFTR), галсульфазу, ларонидазу, N-ацетилгалактозамин 6-сульфатазу, фенилаланин-аммиак лиазу, кислую альфа-глюкозидазу, имиглюцеразу, алглюкозидазу альфа, тиреотропин, гормон роста, инсулин, тиреоидный гормон, эритропоэтин

(EPO), интерлейкин-1 (IL-1), IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-7, интерферон- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ), IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , фактор некроза опухоли (TNF), IL-12, IL-18, fms-подобную тирозинкиназу 3 (flt3), нейропептин-2 (NP2), костные морфогенетические белки (BMP), эпидермальный фактор роста (EGF), эритропоэтин (EPO), фактор роста фибробластов (FGF), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), фактор роста гепатоцитов (HGF), инсулиноподобный фактор роста (IGF), тромбоцитарный фактор роста (PDGF), трансформирующий фактор роста  $\alpha$  и  $\beta$ , фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), рецептор фактора роста фибробластов (FGFR), антагонист FGFR (sFGFR), рецептор трансформирующего фактора роста (TGFR), рецептор фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR), активатор плазминогена, урокиназу, фактор VIII, фактор IX, фактор фон Виллебранда, гормон роста, металлопротеиназу с тромбоспондиновым мотивом 1 (METH-1), METH-2, фрагменты триптофанил-тРНК синтетазы (TrpRS), белок, родственной пролиферину, фрагмент пролактина, фактор пигментного эпителия (PEDF), вазостатин, ангиостатин, эндостатин, кининостатин, фрагмент фибриногена-E, тромбоспондин, тумстатин, канстатин рестин, растворимую fms-подобную тирозинкиназу-1 (sFlt-1), растворимые рецепторы фактора роста эндотелия сосудов (sFlk), растворимый нейропептин 1 (sNRP1), индуцируемый интерфероном гамма белок 10 (IP-10), тромбоцитарный фактор 4 (PF-4), G $\alpha$ -бета, растворимый рецептор эфрина типа-B 4 (sEphB4), растворимый эфрин B2, IGF-1, тимидинкиназу вируса простого герпеса (HSV-TK), карбокси-пептидазу G2 (CPG2), карбоксилэстеразу (CA), цитозиндезаминазу (CD), цитохром P450 (сyt-450), дезоксицитидинкиназу (dCK), нитроредуктазу (NR), пурин-нуклеозид-фосфориллазу (PNP), тимидинфосфориллазу (TP), тимидинкиназу вируса ветряной оспы (VZV-TK), ксантин-гуанинфосфорибозилтрансферазу (XGPRT), аспартилглюкозаминидазу,  $\alpha$ -галактозидазу А, тиоэстеразу пальмитоилированных белков, трипептидил пептидазу, лизосомный трансмембранный белок, транспортер цистеина, кислую церамидазу, кислую  $\alpha$ -L-фукозидазу, защитный белок/катепсин А, кислую  $\beta$ -глюкозидазу или глюкоцереброзидазу, кислую  $\beta$ -галактозидазу, идуронат-2-сульфатазу,  $\alpha$ -L-идуридазу, галактоцереброзидазу, кислую  $\alpha$ -маннозидазу, кислую  $\beta$ -маннозидазу, арилсульфатазу В, арилсульфатазу А, N-ацетилгалактозамин-6-сульфат сульфатазу, N-ацетилглюкозамин-1-фосфотрансферазу, кислую сфингомиелиназу, болезнь Ниманна-Пика, тип С1 (NPC-1),  $\beta$ -гексозаминидазу В, гепаран N-сульфатазу,  $\alpha$ -N-ацетилглюкозаминидазу (NaGlu), ацетил-СоА: $\alpha$ -глюкозаминид N-ацетилтрансферазу, N-ацетилглюкозамин-6-сульфат сульфатазу,  $\beta$ -глюкуронидазу, кислую липазу, неприлизин, деградирующий инсулин фермент инсулизин, тимет олигопептидазу, кальбиндин D28, парвальбумин, фактор, индуцируемый гипоксией, 1-альфа (HIF1-альфа), сиртуин-2 (SIRT-2), белок выживаемости мотонейронов-1 (SMN-1), SMN-2, глиальный нейротрофический фактор (GDNF), цилиарный нейротрофический фактор (CNF), рецептор липопротеина низкой плотности (LDLR), липопротеинлипазу (LPL), альфа-1-антитрипсин (ААТ), УДФ-глюкуронилтрансферазу (UGT), UGT1A1, глюкоза-6 фосфатазу, фосфоенолпируваткарбоксикиназу, галактоза-1 фосфат уридил трансферазу, фенилаланин гидроксилазу, дегидрогеназу разветвленных альфа-кетокислот, фумарилацетоацетат гидролазу, метилмалонил-СоА мутазу, орнитинтранскарбамилазу, синтетазу аргинин-янтарной кислоты, аденозиндезаминазу, гипоксантингуанинфосфорибозилтрансферазу, биотинидазу, бета-глюкоцереброзидазу, бета-глюкуронидазу, порфобилиногендезаминазу (PBDG) или 53.

В некоторых случаях предусмотренные в настоящем документе композиции в контейнерах кодируют полипептид, который увеличивает образование мышц у животных, увеличивает рост волос у животных, увеличивает образование шерсти у животного, усиливает рост животного или участвует в синтезе или использовании питательных веществ. Кодированный полипептид может представлять собой ингибитор миостатина, гормон роста, IGF-1, рилизинг фактор гормона роста, Ski курицы, серин трансферазу или о-ацетилсерин сульфгидридазу. В определенных примерах ингибитор миостатина представляет собой фоллистатин.

#### Краткое описание графических материалов

На фиг. 1А приведена схема анатомии печени, изображающая отдельные доли и кровоснабжение каждой доли. Печень традиционно разделяют на четыре доли: левая анатомическая доля, правая анатомическая доля, хвостовая доля и квадратная доля. В печени крысы этими анатомически отдельными долями являются: средняя доля (10), левая латеральная доля (11), правая доля (13) и хвостовая доля (12). Средняя доля находится непосредственно под диафрагмой. Она прикрепляется к диафрагме посредством серповидной связки, которая образует междольчатую фиссуру и разделяет долю на левую и правую части. Средняя доля составляет около 40% общей массы печени. Левая латеральная доля находится ниже средней доли и выше хвостовой доли. Междольчатые связки прикрепляют левую латеральную долю к верхней части хвостовой доли. Левая латеральная доля составляет приблизительно 30% общей массы печени. Правая доля находится правее полой вены (1) и состоит из двух четко определенных частей, правая верхняя доля и правая нижняя доля. Правая верхняя доля имеет сферическую форму. Прикрепляющим ее элементом является печеночно-диафрагмальная связка. Правая нижняя доля имеет треугольную форму с вершиной, направленной в сторону полой вены. Правая доля составляет 20% общей массы печени. Левая доля находится левее полой вены, непосредственно ниже левой латеральной доли. Доля раз-

делена на две части: верхняя хвостовая часть и нижняя хвостовая часть. Верхняя хвостовая доля прикрепляется к левой латеральной доле посредством междольчатой связки и к желудку посредством печеночно-желудочной связки. Нижняя часть хвостовой доли находится позади желудка. Хвостовая доля составляет 7% общей массы печени.

Поток крови в печень осуществляется через портальную вену (6) и печеночные артерии (5), которые при входе в печень разветвляются направо и налево для кровоснабжения различных долей. Первая ветвь направляется направо как правая нижняя портальная вена (7) и правая верхняя портальная вена (8) для кровоснабжения правой доли. Вторая ветвь направляется налево как хвостовая портальная вена (4), которая распадается на две вены: верхнюю хвостовую ветвь и нижнюю хвостовую ветвь. Портальная вена продолжается до своей основной точки бифуркации, давая правую среднюю портальную вену (9), которая снабжает правую часть средней доли, и левую портальную вену, которая дает левую среднюю портальную вену (2) и левую латеральную портальную вену (3), снабжающие соответствующие доли. Артериальное кровоснабжение печени обеспечивается печеночными артериями, которые при входе в печень разветвляются направо и налево для кровоснабжения долей и далее распределяются так же, как портальные вены.

На фиг. 1В изображено дальнейшее деление печени, основанное на функциональных/сосудистых особенностях печени. Три главные печеночные вены (правая печеночная вена, средняя печеночная вена и левая печеночная вена) разделяют печень человека на четыре секции или сегмента (правый задний сегмент, правый передний сегмент, левый средний сегмент и левый латеральный сегмент), каждый из которых снабжается соответствующими ветвями портальной системы. Дальнейшее ветвление портальных вен подразделяет печень человека на восемь анатомически независимых подсегментов, каждый со своей выносящей печеночной венозной системой, приносящей портальной венозной системой, приносящей артериальной системой и системой желчных протоков. Подсегменты I и IV соответствуют левому среднему сегменту, подсегменты II и III соответствуют левому латеральному сегменту, подсегменты V и VIII соответствуют правому заднему сегменту и подсегменты VI и VII соответствуют правому переднему сегменту.

На фиг. 2 приведено сравнение активности люциферазы при доставке рекомбинантного аденовируса путем внутривенного введения в полую вену (фиг. 2А) и путем интерстициального введения в паренхиму хвостовой доли при блокировании кровотока через хвостовую долю с помощью зажима для сосудистой ножки (фиг. 2В). Результаты демонстрируют экспрессию люциферазы только в хвостовой доле после временной компартментализации.

На фиг. 3 показано присутствие аденовирусной ДНК в общей системе кровообращения, когда она доставляется с помощью компартментализованного способа. Так, на фиг. 3А показано отсутствие аденовирусной ДНК при прекращении сосудистой изоляции хвостовой доли через 30 или 60 мин, но также показано, что аденовирусная ДНК была обнаружена на системном уровне при прекращении сосудистой изоляции хвостовой доли через 7 или 15 мин. На фиг. 3В показана кинетика присутствия аденовирусной ДНК после начала и прекращения 30-минутной сосудистой изоляции (посредством зажима для сосудистой ножки). Результаты демонстрируют отсутствие аденовирусной ДНК в периферической крови через 1, 3 и 5 мин после инъекции аденовируса (при зажатии) и через 1, 3 и 5 мин после снятия зажима (высвобождение после снятия зажима).

На фиг. 4 показаны уровни активности люциферазы в хвостовой доле при введении разных доз рекомбинантного аденовируса в паренхиму хвостовой доли крыс при сосудистой изоляции. Пунктирная линия показывает максимальное количество экспрессии, которая достигается при использовании внутривенной инфузии того же самого вектора в той же самой дозе. Результаты демонстрируют, что сосудистая изоляция значительно увеличивает экспрессию нуклеиновой кислоты и обеспечивает контроль уровня экспрессии белка зависимым от дозы образом на основе количества предусмотренного вирусного вектора.

Фиг. 5 демонстрирует устойчивую экспрессию люциферазы в хвостовой доле, продолжающуюся до 1 года, в компартментализованной модели генотерапии печени после введения рекомбинантного аденовируса в паренхиму хвостовой доли крыс при сосудистой изоляции.

На фиг. 6 приведены уровни экспрессии цитокинов (TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , TGF $\beta$  и IL-6), индуцированной в долях печени при доставке рекомбинантного аденовируса в компартментализованную хвостовую долю или при доставке рекомбинантного аденовируса внутривенно (IV). В качестве положительного контроля использовали экспрессию  $\beta$ -актина. Результат демонстрирует стойкую экспрессию цитокинов во всех долях в группе, в которой аденовирус вводили внутривенно. В группах, в которых аденовирус вводили в компартментализованную долю, наблюдали пониженную экспрессию цитокинов, причем только в хвостовой доле.

На фиг. 7 приведено сравнение экспрессии гена люциферазы в образцах ткани из левой средней доли (сравни; место инъекции), левой латеральной доли, правой латеральной доли и правой средней доли, где образцы взяты в местах, которые являются проксимальными, медиальными и дистальными по отношению к месту инъекции, при доставке рекомбинантного аденовируса в паренхиму левой медиальной

доли свиней, при блокировании кровотока с помощью зажима на паренхиму. Результат демонстрирует экспрессию люциферазы только в месте инъекции.

На фиг. 8 приведены уровни белка альфа-фетопротеина (AFP) в сыворотке крови крыс через семь (7) дней после доставки рекомбинантного аденовируса, кодирующего AFP, в компартментализованную хвостовую долю печени крыс.

### Подробное описание изобретения

Содержание.

A. Определения.

B. Доставка нуклеиновых кислот и генотерапия.

1. Существующие способы генотерапии.

2. Доставка непосредственно в компартментализованную ткань или орган.

C. Компартментализованный способ (способ с разделением) для доставки нуклеиновой кислоты.

1. Компартментализация ткани или органа.

a. Печень.

b. Другие органы.

2. Доставка нуклеиновых кислот путем введения доставляемого агента.

a. Способы доставки и способы введения.

b. Способы облегчения доставки.

c. Дозы и схемы для доставки.

3. Прекращение/снятие компартментализации.

D. Доставляемые агенты.

1. Молекула нуклеиновой кислоты.

2. Носители и конструкции, содержащие молекулу нуклеиновой кислоты.

a. Вирус и вирусный вектор.

i. Аденовирус.

ii. Аденоассоциированный вирус (AAV).

iii. Ретровирус.

iv. Лентивирус.

b. Невирусные векторы. Наночастица.

c. Целая клетка.

3. Примеры агентов для генотерапии.

E. Композиции, системы и наборы.

1. Дозированные композиции.

2. Комбинации.

3. Готовые изделия и наборы.

F. Оценка доставки, экспрессии или эффективности.

1. Мониторинг доставляемого агента.

2. Токсичность для хозяина и иммунная активация.

G. Применения и способы применения.

1. Лечение заболеваний и расстройств.

a. Гемофилия A и B.

b. Семейная гиперхолестеринемия.

c. Сахарный диабет I типа.

d. Дефицит альфа-1-антитрипсина (ААТ).

e. Ангиогенез и рак.

f. Аутоиммунные и воспалительные расстройства (например, рассеянный склероз).

g. Острая интермиттирующая порфирия (АІР).

h. Синдром Санфилиппо (мукополисахаридоз III типа; MPSIII).

i. Дефицит липопротеинлипазы (LPLD).

2. Экспрессия и продукция белка.

3. Ветеринарные и сельскохозяйственные применения.

H. Примеры.

A. Определения.

Если не определено иначе, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области, к которой относится изобретение. Все патенты, патентные заявки, опубликованные заявки и публикации, последовательности Genbank, базы данных, веб-сайты и другие опубликованные материалы, которые упоминаются во всем описании в настоящем документе, если не указано иное, включены в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте. В том случае, если существует множество определений для терминов в настоящем документе, предпочтительными являются определения, указанные в этом разделе. Когда ссылка дается на URL или другой такой идентификатор или адрес, следует понимать, что такие идентификаторы могут измениться, и конкретная информация в Интернете может появляться и исчезать, но

эквивалентную информацию можно найти путем поиска в интернете. Ссылка на это указывает на доступность и публичное распространение такой информации.

Использованные в настоящем документе термины "с разделением", "компарментализация" или "компарментализованный" или их грамматические вариации (также относящиеся в настоящем документе к сосудистой изоляции) в контексте ткани или органа, или его части относятся к изоляции ткани или органа, или его части от системного кровообращения. Изоляцию можно осуществить путем блокирования или пережатия одной или нескольких, и, как правило, всех, артерий, вен, протоков или сосудов, которые проходят через ткань или орган или его часть, и которые впадают, имеют доступ или иным образом связаны с общей системой кровообращения. Компарментализация ткани или органа характеризуется остановкой или задержкой кровотока в ткани, или органе, или в части или в области ткани или органа. Компарментализация нарушает связь или доступ между тканью и органом, или частью или областью ткани или органа и остальным телом через общую систему кровообращения. Компарментализацию можно осуществить любым способом, который блокирует или пережимает одну или несколько артерий, вен, протоков или сосудов, например, используя катетеры, бандажи, жгуты или окклюзионные зажимы.

Использованная здесь формулировка "поток крови в ткань или орган или его часть уменьшается или устраняется" или аналогичная формулировка означает, что существуют препятствия или блокада кровоснабжения или кровообращения из артерий, вен, протоков и/или сосудов, обслуживающих или проходящих через ткань или орган, или его часть, тем самым лишая ткань или орган или его части доступа веществ, переносимых кровью. Такая блокада может привести к аноксии или ишемии ткани или органа или части ткани или органа. Контроль сокращения или прекращения потока крови в ткани или органе находится в пределах компетентности специалиста в данной области техники. Например, сокращение или прекращение потока крови можно контролировать по цвету ткани; на основании оксиметрии методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) с использованием индийских чернил или другого регистрируемого красителя; с использованием спектроскопии ткани (TiSpec); перфузионной магнитной резонансной визуализации, позитронно-эмиссионной томографии, спектроскопии в ближней инфракрасной области спектра (БИК), оптической доплеровской томографии, ультразвука и других способов, известных специалисту в данной области техники. Для целей способов в настоящем документе поток крови в ткань или орган или часть ткани или органа должен быть уменьшен более чем на 75, 80, 85, 90, 95 и вплоть до 100% в процессе компарментализации ткани или органа, или его части.

Использованные в настоящем документе термины "общая система кровообращения" или "системное кровообращение" относятся к системному кровообращению, которое несет оксигенированную кровь из левого желудочка к тканям тела, и возвращает венозную кровь в правое предсердие.

Использованные в настоящем документе термины орган или ткань относятся к дифференцированным частям тела субъекта, которые выполняют специфичную функцию. Ткани обычно представляют собой группу специализированных клеток, которые сгруппированы вместе для выполнения специализированной функции. Например, мышечная ткань представляет собой специализированную ткань, которая может сокращаться. Органы состоят из тканей, которые выполняют функцию. Примеры органов включают, но не ограничиваются ими, глаза, уши, легкие, печень, почки, сердце или кожу.

Использованная здесь ссылка на "часть ткани или органа" относится к части ткани или органа тела субъекта. Часть может представлять собой область, сегмент, долю, секцию или другую часть ткани или органа. Часть, как правило, является той частью, которая может быть мобилизована или изолирована отдельно от остальной ткани или органа, чтобы можно было осуществить компарментализацию части от остальной ткани или органа. Частью также является часть, которая достаточна для осуществления доставки агента. Определение соответствующего размера части ткани или органа, достаточного для компарментализации и/или для осуществления доставки агента, находится в пределах компетентности специалиста в данной области техники, и он зависит от конкретного органа, инструмента, используемого для компарментализации, показания, которое подвергается лечению, дозы, размера субъекта и других параметров. Как правило, часть ткани или органа имеет объем по меньшей мере примерно 5, 10 мм<sup>3</sup> или больше. Например, часть может быть областью ткани или органа, которая имеет длину от 0,5 до 25 см, высоту (или толщину) от 0,5 до 20 см и/или глубину от 0,5 до 15 см. В качестве примера частью доли или сегмента печени является такая часть, которая имеет длину от 5 до 10 см, высоту от 1 до 3 см и глубину (от вершины) от 1,5 до 3 см. Также предусмотрены меньшие области или части при условии, что часть можно компарментализовать.

Использованный в настоящем документе термин восстановление связи в контексте компарментализации относится к процессу, с помощью которого можно прекратить компарментализацию ткани или органа или части ткани или органа, так что восстанавливается или возобновляется доступ к общей системе кровообращения ткани или органа. Это можно достичь путем удаления устройства, аппарата или прекращения процесса, используемого для блокады или окклюзии одной или нескольких, и, как правило, всех, артерий, вен, протоков или сосудов, которые проходят через ткань или орган или его часть.

Использованный в настоящем документе термин заранее установленное время в контексте прекращения компарментализации перед восстановлением связи с общей системой кровообращения означает ограниченный период времени, известный заранее и который можно контролировать. Как правило, зара-

нее установленное время представляет собой время после введения или доставки доставляемого агента, за которое по меньшей мере или примерно по меньшей мере 80, 85, 90, 95% или больше доставляемого агента окажется внутри клеток паренхимы ткани или органа (например, в гепатоцитах печени). Обычно такое время представляет собой время, для которого меньше 10, 5% или меньше доставляемого агента присутствует в общей системе кровообращения после восстановления связи путем прекращения компартиментализации. Такое время может определить специалист в данной области техники опытным путем, и оно зависит, например, от конкретного органа-мишени и доставляемого агента. В конкретных примерах заранее установленное время составляет по меньшей мере примерно или 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 или 60 мин после начала компартиментализации и/или введения доставляемого агента. Заранее установленное время можно контролировать способами, механизмами или техническими методами, которые увеличивают поглощение доставляемого агента клетками. Такие способы известны специалисту в данной области техники и описаны в настоящем документе. Таким образом, в некоторых примерах заранее установленное время может составлять меньше 15 мин, например от 5 до 15 мин.

Использованный в настоящем документе термин паренхима относится к частям ткани и ассоциированным клеткам органа, которые выполняют специфичную функцию органа и составляют основную часть органа. Таким образом, паренхима представляет собой главную основную функциональную ткань органа. Она может включать эпителиальную ткань, мышечную ткань, нервную ткань и ассоциированные с ними клетки. Паренхима отличается от стромы, которая представляет собой соединительную ткань, кровеносные сосуды, нервы и протоки. Таким образом, паренхима не включает соединительную ткань, кровеносные сосуды, нервы и протоки. Например, паренхима печени включает гепатоциты, паренхима сердца включает сердечные мышечные клетки, такие как миоциты, паренхима почек включает нефроны. Паренхима кожи представляет собой эпидермис.

Использованный в настоящем документе термин "паренхимная клетка" относится к клеткам, которые содержатся в паренхиме ткани или органа или составляют паренхиму ткани или органа. Например, гепатоциты являются клетками основной ткани печени, которые составляют до 70-80% массы печени. В легких 75% всех клеток легких содержатся в паренхиме. Они включают, например, фибробласты интерстиция и эпителиальные клетки, которые выстилают альвеолы, такие как клетки 1 и 2 типов (пневмоциты) и щеточные клетки. В коже клетки, находящиеся в паренхиме, включают эпидермальные клетки, такие как кератиноциты. Специалист в данной области техники знаком с паренхимой различных тканей и органов и клетками в ней.

Использованный в настоящем документе термин введение в паренхиму относится к введению в паренхиму ткани или органа. Введение в паренхиму осуществляют, как правило, путем инъекции или капиллярной диффузии.

Использованный в настоящем документе термин зажим относится к устройству, такому как хирургическое устройство, используемому для сжатия структуры, такой как орган, сосуд или ткань. Зажим обычно имеет противоположные стороны или части, которые могут быть приведены в движение или приспособлены к созданию давления или силы на противоположные стороны структуры, чтобы сжать эту структуру. Зажим может иметь бранши с зубцами, блокираторы рукояток и/или надувные баллоны. Обычно силу или давление зажима можно регулировать.

Использованный в настоящем документе термин "зажим на паренхиму" относится к зажиму, который может сжимать паренхиму ткани или органа. Зажим на паренхиму включает зажимы для сосудистой ножки.

Использованный в настоящем документе термин лапароскопическая хирургия относится к хирургии, которая проводится через небольшие разрезы (например, между 0,5 и 1,5 см) и с использованием лапароскопа.

Использованный в настоящем документе термин "доставляемый агент" относится к агенту или переносчику, такому как носитель, вектор или конструкция, который содержит молекулу нуклеиновой кислоты для генотерапии и который облегчает проникновение молекулы нуклеиновой кислоты в клетки и/или ее экспрессию. Таким образом, доставляемый агент представляет собой объект, который вводят субъекту и который содержит молекулу нуклеиновой кислоты, упакованную в нем или ассоциированную с ним. Примеры доставляемых агентов включают, но не ограничиваются ими, вирус, вирусоподобные частицы, миникольца, плазмиду или вектор, липосому и/или наночастицу. Например, доставляемый агент может включать композицию на основе липида или другую композицию на полимерной основе, такую как липосома, мицелла или обратная мицелла, которая ассоциирована с молекулой нуклеиновой кислоты или другим агентом, таким как предусмотренные в настоящем документе невирусный вектор или вирус, для доставки в субъекта-хозяина. В некоторых примерах доставляемым агентом может быть оголенная ДНК. Поглощение доставляемых агентов можно дополнительно увеличить или облегчить, используя различные механические методы, такие как электропорация, сонопорация или "генная пушка".

Использованные в настоящем документе термины "генетическая терапия" или "генотерапия" включают перенос молекулы нуклеиновой кислоты, такой как гетерологичная ДНК, в некоторые клетки, клетки-мишени млекопитающего, в частности человека, с расстройством или состоянием, для которого предполагается такая терапия. ДНК вводят в выбранные клетки-мишени таким образом, что гетероло-

гичная ДНК экспрессируется, и кодируемый терапевтический продукт, таким образом, продуцируется. Альтернативно, гетерологичная ДНК может некоторым образом опосредовать экспрессию ДНК, которая кодирует терапевтический продукт, она может кодировать продукт, такой как пептид или РНК, который некоторым образом опосредует, прямо или косвенно, экспрессию терапевтического продукта. Генетическую терапию также можно использовать для доставки нуклеиновой кислоты, кодирующей продукт гена для замены дефектного гена или дополнения продукта гена, продуцируемого млекопитающим или клеткой, в которую она введена. Введенная нуклеиновая кислота может кодировать терапевтическое соединение (например, фактор роста или его ингибитор, или фактор некроза опухоли или его ингибитор, такой как его рецептор), которое в норме не продуцируется в млекопитающем-хозяине или не продуцируется в терапевтически эффективном количестве или в терапевтически пригодное время. Гетерологичная ДНК, кодирующая терапевтический продукт, может быть модифицирована перед введением в клетки больного хозяина для того, чтобы усилить или иным образом изменить продукт или его экспрессию.

Использованный в настоящем документе термин молекула нуклеиновой кислоты относится к одноцепочечным и/или двухцепочечным полинуклеотидам, таким как дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) и рибонуклеиновая кислота (РНК), а также к аналогам или производным либо РНК, либо ДНК. Также термин "нуклеиновая кислота" включает аналоги нуклеиновых кислот, такие как пептидная нуклеиновая кислота (ПНК), тиофосфатная ДНК и другие такие аналоги и производные. Нуклеиновые кислоты могут кодировать продукты генов, такие как, например, полипептиды, регуляторные РНК, микроРНК, малые ингибирующие РНК (миРНК) и функциональные РНК. Таким образом, молекула нуклеиновой кислоты означает все типы и размеры молекул ДНК, в том числе миРНК, аптамеры, рибозимы, комплементарную ДНК (кДНК), плазмиды и ДНК, включающую модифицированные нуклеотиды и аналоги нуклеотидов.

Использованный в настоящем документе термин терапевтическая нуклеиновая кислота представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, которая кодирует терапевтический продукт или может давать терапевтический эффект. Продуктом может быть нуклеиновая кислота, такая как регуляторная последовательность или ген, или может кодировать белок, который имеет терапевтическую активность или эффект. Например, терапевтическая нуклеиновая кислота может представлять собой рибозим, антисмысловую, двухцепочечную РНК, нуклеиновую кислоту, кодирующую белок, или другие молекулы нуклеиновой кислоты.

Использованный в настоящем документе термин терапевтический продукт представляет собой соединение, которое может давать терапевтический эффект. Соединение может представлять собой полипептид, пептид, ДНК или РНК.

Использованный в настоящем документе термин гетерологичная нуклеиновая кислота в контексте нуклеиновой кислоты, содержащейся в геноме вируса (также называемой экзогенная нуклеиновая кислота или чужеродная нуклеиновая кислота), относится к нуклеиновой кислоте, которая в норме не продуцируется *in vivo* организмом или вирусом, из которого она экспрессируется, или которая продуцируется организмом или вирусом, но находится в другом локусе, или которая опосредует или кодирует медиаторы, которые изменяют экспрессию эндогенной нуклеиновой кислоты, такой как ДНК, влияя на транскрипцию, трансляцию или другие регулируемые биохимические процессы. Таким образом, гетерологичная нуклеиновая кислота обычно не является эндогенной для организма или вируса, в который она введена. Гетерологичная нуклеиновая кислота может относиться к молекуле нуклеиновой кислоты из другого вируса в том же самом организме или другом организме, в том числе, того же вида или другого вида. Гетерологичная нуклеиновая кислота, тем не менее, может быть эндогенной, но тогда представляет собой нуклеиновую кислоту, которая экспрессируется из другого локуса, или экспрессия или последовательность которой изменены (например, плазида). Таким образом, гетерологичная нуклеиновая кислота включает молекулу нуклеиновой кислоты, не находящуюся в точно такой же ориентации или позиции как соответствующая молекула нуклеиновой кислоты, такая как, ДНК, присутствующая в геноме. Обычно, хотя не обязательно, такая нуклеиновая кислота кодирует РНК и белки, которые в норме не продуцируются организмом или вирусом или не продуцируются тем же образом в вирусе, в котором она экспрессируется. Термин гетерологичная нуклеиновая кислота в настоящем документе включает любую нуклеиновую кислоту, такую как ДНК, которую специалист в данной области техники считает или рассматривает как гетерологичную, экзогенную или чужеродную для вируса, в котором это нуклеиновая кислота экспрессируется. Примеры гетерологичной нуклеиновой кислоты включают, но не ограничиваются ими, нуклеиновую кислоту, которая кодирует экзогенные пептиды/белки, в том числе диагностические и/или терапевтические агенты. Белки, кодируемые гетерологичной нуклеиновой кислотой, могут экспрессироваться в вирусе, секретироваться, или экспрессироваться на поверхности вируса, в который была введена гетерологичная нуклеиновая кислота.

Использованные в настоящем документе термины обнаруживаемая метка или обнаруживаемый фрагмент относятся к атому, молекуле или композиции, в которых присутствие атома, молекулы или композиции может быть прямо или косвенно измерено. Обнаруживаемые метки могут использоваться, будучи включены в любой доставляемый агент из настоящего документа. Обнаруживаемые метки включают, например, хемилюминесцентные фрагменты, биоломинесцентные фрагменты, флуоресцентные

фрагменты, радионуклиды и металлы. Например, обнаруживаемые фрагменты включают, например, люциферазу, зеленый флуоресцентный белок, красный флуоресцентный белок, коллоидное золото, железо, гадолиний и галлий-67. Способы для обнаруживаемых меток хорошо известны в данной области техники. Такая метка может быть обнаружена, например, визуальным способом, с помощью флуоресцентной спектроскопии, измерения коэффициента отражения, проточной цитометрии, рентгеновского анализа, различных методов магнитного резонанса, таких как получение изображений методом ядерного магнитного резонанса (MRI) и магнитно-резонансная спектроскопия (MRS). Способы обнаружения также включают любые варианты томографических методов, в том числе компьютерную томографию (СТ), компьютерную аксиальную томографию (САТ), электронно-лучевую компьютерную томографию (ЕВСТ), компьютерную томографию высокого разрешения (HRСТ), гипоциклоидную томографию, позитронно-эмиссионную томографию (РЕТ), однофотонную эмиссионную компьютерную томографию (SPECT), спиральную компьютерную томографию и ультразвуковую томографию. Прямое обнаружение обнаруживаемой метки относится, например, к измерению физического явления, связанного с обнаруживаемой меткой как таковой, такого как эмиссия или абсорбция энергии или частиц меткой как таковой, например, с помощью рентгеновского анализа или MRI. Косвенное обнаружение относится к измерению физического явления, связанного с атомом, молекулой или композицией, которое непосредственно или косвенно связано с обнаруживаемой меткой, такого как эмиссия или абсорбция энергии или частиц атомом, молекулой или композицией, которые непосредственно или косвенно связаны с обнаруживаемой меткой. В примере косвенного обнаружения, который не является ограничивающим, обнаруживаемая метка может представлять собой биотин, который можно обнаружить с помощью связывания с авидином. Немеченный авидин можно вводить системно после системного введения меченного авидина для блокирования неспецифического связывания. Таким образом, обнаруживаемая метка или обнаруживаемый фрагмент охватывают связываемую метку или связываемый фрагмент, которые относятся к атому, молекуле или композиции, в которых присутствие атома, молекулы или композиции может быть обнаружено как результат связывания метки или фрагмента с другим атомом, молекулой или композицией.

Использованный в настоящем документе термин конструкция ДНК представляет собой одно- или двухцепочечную, линейную или кольцевую молекулу ДНК, которые содержат сегменты ДНК, комбинированные и соединенные вместе таким образом, который не обнаруживается в природе. Конструкции ДНК существуют как результат манипуляций человека и включают клоны и другие копии молекул, подвергшихся манипуляциям.

Использованный в настоящем документе термин вектор (или плаزمид) относится к дискретным элементам, которые используются для введения гетерологичной нуклеиновой кислоты в клетки, либо для ее экспрессии, либо репликации. Векторы, как правило, остаются эписомальными, но могут быть созданы таким образом, чтобы осуществлять интеграцию гена или его части в хромосому генома. Векторы включают невирусные векторы, такие как невирусные векторы экспрессии. Также включены векторы, которые представляют собой искусственные хромосомы, такие как искусственные хромосомы дрожжей и искусственные хромосомы млекопитающих. Векторы также включают "вирусные векторы". Выбор и применение таких носителей хорошо известны специалистам в данной области техники.

Использованный в настоящем документе термин вектор экспрессии включает векторы, способные экспрессировать ДНК, которая функционально связана с регуляторными последовательностями, такими как промоторные области, способные осуществлять экспрессию таких фрагментов ДНК. Такие дополнительные сегменты могут включать промоторные и терминирующие последовательности, и необязательно могут включать одну или несколько точек начала репликации, один или несколько селективируемых маркеров, энхансеров, сигналов полиаденилирования и тому подобное. Векторы экспрессии обычно происходят из плазмиды или вирусной ДНК или могут содержать элементы плазмиды и вирусной ДНК. Таким образом, вектор экспрессии относится к конструкции рекомбинантной ДНК или РНК, такой как плазмиды, фаг, рекомбинантный вирус или другой вектор, который при введении в соответствующую клетку-хозяина приведет к экспрессии клонированной ДНК. Соответствующие векторы экспрессии хорошо известны специалистам в данной области техники и включают векторы экспрессии, которые реплицируются в эукариотических клетках и/или прокариотических клетках, и векторы экспрессии, которые остаются эписомальными, или векторы экспрессии, которые интегрируются в геном клетки-хозяина.

Использованный в настоящем документе термин "вирус" относится к любому из большой группы инфекционных патогенов, которые не могут расти или воспроизводиться вне клетки-хозяина. Вирусы, как правило, содержат белковую оболочку, окружающую кор генетического материала РНК или ДНК, но не полупроницаемую мембрану, и способны расти и размножаться только в живых клетках. Вирусы включают вирусы, которые образуются, когда, например, вектор, содержащий весь или часть вирусного генома, трансдуцируют в соответствующую клетку или клеточную линию для образования таких частиц. Полученные вирусные частицы имеют множество применений, включая, но не ограничиваясь ими, трансфекция нуклеиновых кислот в клетки *in vitro*, либо *in vivo*. Таким образом, вирус представляет собой упакованный вирусный геном. Вирус может относиться к одной частице, группе частиц или к вирусному геному.

Использованный в настоящем документе термин вирусный вектор относится к конструкции вектора

нуклеиновой кислоты, которая включает по меньшей мере один элемент вирусного происхождения, и может быть упакована в частицу вирусного вектора или вирус. Ссылка на вирусный вектор в настоящем документе используется на равных основаниях с вирусом в том случае, если он упакован в белковую оболочку. Частицы вирусного вектора или вируса можно использовать с целью трансфекции ДНК, РНК или других нуклеиновых кислот в клетки *in vitro*, либо *in vivo*. Вирусные векторы включают, но не ограничиваются ими, ретровирусные векторы, векторы на основе осповакцины, лентивирусные векторы, векторы на основе вируса герпеса (например, HSV), бакуловирусные векторы, векторы на основе цитомегаловируса (CMV), векторы на основе папилломавируса, векторы на основе вируса обезьяны (SV40), векторы на основе вируса Синдбис, векторы на основе вируса леса Семлики, векторы на основе фагов, аденовирусные векторы и векторы на основе аденоассоциированных вирусов (AAV). Подходящие вирусные векторы описаны, например, в патенте США №№ 6057155, 5543328 и 5756086. Вирусные векторы, как правило, включают генетически сконструированные вирусы, которые функционально связаны с экзогенными генами для переноса (в качестве носителя или переносчика) экзогенных генов в клетки.

Использованный в настоящем документе термин функционально связанный в контексте нуклеиновой кислоты, расположенной с регуляторными и эффекторными последовательностями нуклеотидов, такими как промоторы, энхансеры, сайты терминации транскрипции и трансляции, и другими сигнальными последовательностями, относится к связи между нуклеиновой кислотой, такой как ДНК, и такими последовательностями нуклеотидов, так что они функционируют в соответствии с их прямым назначением, например транскрипция инициируется на промоторе и продолжается дальше через кодируемый сегмент до терминатора. Например, нуклеиновая кислота, функционально связанная с промотором, относится к физической связи между ДНК и промотором, так что транскрипция такой ДНК инициируется на промоторе РНК полимеразой, которая его специфично распознает, связывает, и транскрибирует ДНК. Таким образом, функционально связанный или функционально ассоциированный относится к функциональной связи нуклеиновой кислоты, такой как ДНК, с регуляторными и эффекторными последовательностями нуклеотидов, такими как промоторы, энхансеры, сайты терминации транскрипции и трансляции, и другими сигнальными последовательностями. Для того чтобы оптимизировать экспрессию и/или транскрипцию, может быть необходимо удалить, добавить или изменить 5'-нетранслируемую область клонов для элиминации лишних, возможно неподходящих, альтернативных инициирующих трансляцию (т.е. стартовых) кодонов или других последовательностей, которые могут влиять на экспрессию или снижать ее, либо на уровне транскрипции, либо на уровне трансляции. Кроме того, непосредственного после 5' старт-кодона может быть вставлен консенсусный сайт связывания рибосомы, и он может усиливать экспрессию (см., например, Kozak J. *Biol. Chem.* 266: 19867-19870 (1991) и Shine and Delgarno, *Nature* 254(5495):34-38 (1975)). Желательность (или необходимость) такой модификации можно определить опытным путем.

Использованный в настоящем документе термин антисмысловая относится к нуклеиновой кислоте (ДНК, РНК или химический аналог), которая комплементарна информационной РНК нужного гена и может связываться с ней и инактивировать ее.

Использованный в настоящем документе термин малая интерферирующая РНК (миРНК) относится к классу двухцепочечных молекул РНК длиной 20-25 нуклеотидов, которые могут мешать экспрессии гена.

Использованный в настоящем документе термин аптамер относится к олигонуклеотидам (ДНК или РНК), которые связываются с мишенью, такой как малая молекула, белок, нуклеиновая кислота, клетка или ткань. Аптамеры могут быть сконструированы и могут пройти селекцию против молекулы-мишени с применением способов селекции *in vitro*, таких как использование систематической эволюции лигандов с экспоненциальным обогащением (SELEX).

Аптамеры против различных мишеней известны специалисту в данной области техники.

Использованный в настоящем документе термин рибозим относится к молекуле РНК, которая имеет уникальный активный центр в виде шпильки или hammerhead-структуры и уникальную вторичную структуру, что дает им возможность расщеплять другие молекулы РНК в специфичных последовательностях. Рибозимы включают природные рибозимы, а также рибозимы, которые генетически сконструированы или созданы для расщепления любой молекулы РНК.

Использованный в настоящем документе термин вирусоподобная частица (VLP) относится к неинфекционному агенту, который напоминает вирус, но не содержит никакого вирусного генетического материала. Например, VLP могут собираться при экспрессии вирусных структурных белков (например, оболочки или капсида). VLP включают VLP, которые образуются из парвовирусов (например, аденоассоциированный вирус), ретровирусов (например, HIV) и флавириусов (например, вирус гепатита С).

Использованный в настоящем документе термин миникольцо относится к небольшим кольцевым плазмидам или ДНК векторам, которые являются эписомными и продуцируются в виде кольцевых кассет экспрессии, лишенных какой-либо основы бактериальной плазмиды. Они могут быть получены из родительской бактериальной плазмиды, которая содержит гетерологичную нуклеиновую кислоту и два сайта-мишени рекомбиназы, путем внутримолекулярной (цис-) рекомбинации с использованием сайт-специфической рекомбиназы, такой как интеграза PhiC31. В результате рекомбинации между двумя сай-

тами образуется миникольцо и остаточная миниплазмида. Миникольцо можно выделить отдельно от миниплазмиды. Специалисту в данной области техники известны миникольца и способы их получения.

Термин "оголенный" полинуклеотид, ДНК или РНК относится к последовательности, свободной от любых носителей, комплексов или агентов для доставки, которые действуют таким образом, чтобы помогать, способствовать или облегчать проникновение в клетку, включая вирусные последовательности, вирусные частицы, липосомные композиции, липофектин или осаждающие агенты.

Использованный в настоящем документе термин вирусные частицы (VP) относится к общему количеству вирусных частиц, в том числе живых и мертвых, вместе взятых. Число вирусных частиц можно определить, используя анализ OD<sub>260</sub> очищенного вирусного материала.

Использованный в настоящем документе термин бляшкообразующая единица (БОЕ) или инфекционная единица (ИЕ) относится к количеству инфекционных вирусов или живых вирусов. Таким образом, термин отражает количество активных вирусов в препарате. БОЕ можно определить, используя анализ бляшкообразования или анализ конечных разведений, которые являются стандартными анализами, известными специалисту в данной области техники.

Использованные в настоящем документе термины "аденовирусный вектор" и "вектор на основе аденовируса" используются на равных основаниях, и хорошо известно, что в данной области техники они означают полинуклеотид, содержащий весь или часть генома аденовируса. Аденовирусный вектор относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей полный геном или модифицированный геном аденовируса, или такой нуклеиновой кислот, которую можно использовать для введения гетерологичной нуклеиновой кислоты при переносе в клетку, в частности при упаковке в частицу. Аденовирусный вектор может быть в любой из нескольких форм, включая, но не ограничиваясь ими, в виде оголенной ДНК, РНК, инкапсулированной в капсид аденовируса, ДНК, упакованной в другую вирусную или вирусоподобную форму (такую как простой герпес и AAV), ДНК, инкапсулированной в липосомы, ДНК в комплексе с полилизинном, в комплексе с синтетическими поликатионными молекулами, конъюгированной с трансферрином, в комплексе с соединениями, такими как ПЭГ, которые иммунологически "маскируют" молекулу и/или увеличивают период полувыведения, или конъюгированной с невирусным белком.

Использованный в настоящем документе термин "аденовирус" или "аденовирусная частица" предназначен для включения любого и всех вирусов, которые можно отнести к аденовирусам, в том числе любого аденовируса, который инфицирует человека или животное, включая все группы, подгруппы и серотипы. В зависимости от контекста, ссылка на "аденовирус" может включать аденовирусные векторы. Существует по меньшей мере 51 серотип аденовирусов, которые классифицируют в несколько подгрупп. Например, подгруппа А включает серотипы аденовирусов 12, 18 и 31. Подгруппа В включает серотипы аденовирусов 3, 7, 11а, 11р, 14, 16, 21, 34, 35 и 50. Подгруппа С включает серотипы аденовирусов 1, 2, 5 и 6. Подгруппа D включает серотипы аденовирусов 8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 19р, 20, 22-30, 32, 33, 36-39, 42-49 и 51. Подгруппа Е включает серотип аденовирусов 4. Подгруппа F включает серотипы аденовирусов 40 и 41. Таким образом, использованный в настоящем документе термин аденовирус или аденовирусная частица представляют собой упакованный вектор или геном. Для целей настоящего документа, вирусы, как правило, представляют собой рекомбинантные аденовирусы, содержащие гетерологичную молекулу нуклеиновой кислоты в своем геноме, и образующиеся, когда аденовирусный вектор инкапсулируется в капсид аденовируса.

Аденовирусы включают любые и все вирусы, которые можно отнести к аденовирусам, в том числе любой аденовирус, который инфицирует человека или животное, включая все группы, подгруппы и серотипы. Таким образом, использованные в настоящем документе термины "аденовирус" и "аденовирусная частица" относятся к вирусу как таковому и его производным и охватывают все серотипы и подгруппы, и встречающиеся в природе и рекомбинантные формы, если не указано иное. Включены аденовирусы, которые инфицируют клетки человека. Аденовирусы могут быть дикого типа или могут быть модифицированы различными способами, известными в данной области техники или описанными в настоящем документе. Такие модификации включают, но не ограничиваются ими, модификации генома аденовируса, упакованного в частицу, чтобы получить инфекционный вирус. Примеры модификаций включают делеции, известные в данной области техники, такие как делеции в одном или нескольких из кодирующих районов E1a, E1b, E2a, E2b, E3 или E4. Другие примеры модификаций включают делеции всех кодирующих областей аденовирусного генома. Такие аденовирусы известны как "gutless" аденовирусы. Термины также включают аденовирусы с зависимой от условий репликацией, которые представляют собой вирусы, предпочтительно реплицирующиеся в конкретных типах клеток или тканей и реплицирующиеся в меньшей степени или не реплицирующиеся в других типах клеток или тканей.

Использованные в настоящем документе термины "молекула направленного действия" или "лиганд направленного действия" относятся к любому белку, полипептиду или его части, которые связываются с молекулой на поверхности клетки, включая, но не ограничиваясь ими, с белками, углеводами, липидами и другими такими фрагментами. Лиганды направленного действия включают, но не ограничиваются ими, факторы роста, цитокины, молекулы адгезии, нейропептиды, белковые гормоны и одноцепочечные антитела (scFv).

Использованный в настоящем документе термин наночастица относится к коллоидной частице для

доставки молекулы, которая является микроскопической, имеет размер между примерно 1 и 1000 нм, например между 1 и 100 нм, и которая ведет себя как единое целое с точки зрения транспорта и свойств. Наночастицы включают монокристаллические наночастицы (наносферы), в которых молекула абсорбируется, растворяется или диспергируется в матриксе, и нанокapsулы, в которых молекула ограничена водным или масляным ядром, окруженным стенкой. Альтернативно, молекула может быть ковалентно присоединена к поверхности или к матриксу. Наночастицы включают, например, липосомы, дендримеры, полимерные мицеллы, нанокapsулы, наносферы и твердые липидные наночастицы. Обычно наночастицы сделаны из биосовместимых и биodeградируемых материалов, таких как природные или синтетические полимеры (например, желатин, альбумин, полилактоиды, полиалкилцианоакрилаты) или твердые липиды. Наночастицы включают наночастицы, которые содержат молекулу направленного действия, присоединенную снаружи.

Использованный в настоящем документе термин соединение, конъюгированное с фрагментом, относится к комплексу, который включает соединение, связанное с фрагментом, в котором связывание между соединением и фрагментом может осуществляться за счет одной или нескольких ковалентных связей или нековалентных взаимодействий, таких как водородные связи или электростатические взаимодействия. Конъюгат может также включать линкер, который соединяет соединение с фрагментом. Примеры соединений включают, но не ограничиваются ими, наночастицы и сидерофоры. Примеры фрагментов включают, но не ограничиваются ими, обнаруживаемые фрагменты и терапевтические агенты.

Использованный в настоящем документе термин тропность в контексте доставляемого агента, такого как вирус, относится к селективной инфекционности или связыванию частицы за счет белка капсида, такого как фибер-белок и/или пентон.

Использованные в настоящем документе термины "проникновение" или "поглощение" в контексте клетки относятся к процессу, в котором доставляемый агент вводят в клетку. Таким образом, такие термины означают, что доставляемый агент находится внутри клеток.

Использованный в настоящем документе термин трансдукция означает перенос генетического материала в клетки с помощью вируса.

Использованный в настоящем документе термин "устойчивая" экспрессия в контексте доставляемой молекулы нуклеиновой кислоты относится к периоду времени после введения нуклеиновой кислоты в орган, в течение которого экспрессия составляет по меньшей мере 70, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или больше от наблюдаемой максимальной экспрессии. Как правило, экспрессия является устойчивой, если кодируемый белок экспрессируется в течение периода времени больше чем 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 16, 24 месяца или больше.

Использованный в настоящем документе термин промотор означает часть гена, содержащую последовательности ДНК, которые обеспечивают связывание РНК полимеразы и инициацию транскрипции. Последовательности промотора обычно, но не всегда, находятся в 5' некодирующей области генов.

Использованный в настоящем документе термин получение рекомбинантными способами с использованием методов рекомбинантных ДНК означает применение хорошо известных способов молекулярной биологии для экспрессии белков, кодируемых клонированной ДНК.

В настоящем документе субъектом могут быть позвоночные, в частности млекопитающее (например, человек, лошадь, кошка, собака, корова, свинья, овца, коза, мышь, кролик, крыса и морская свинка), птицы, рептилии, амфибии, рыбы и любые другие животные. Термин не указывает на конкретный возраст или пол. Таким образом, термин также охватывает новорожденных субъектов, мужского или женского пола. Используемые в настоящем документе термины пациент или субъект могут использоваться на равных основаниях и могут относиться к субъекту, нуждающемуся в терапевтическом агенте. Термин пациент или субъект включает человека или ветеринарные субъекты. И терапевтические, и промышленные, и ветеринарные, и сельскохозяйственные (например, производство мяса) применения раскрыты в настоящем документе.

Использованный в настоящем документе термин пациент относится к субъекту человеку.

Использованный в настоящем документе термин композиция относится к любой смеси. Это может быть раствор, суспензия, жидкость, порошок, паста, водная, не водная композиция или любая их комбинация.

Использованный в настоящем документе термин комбинация относится к любой ассоциации двух или более элементов. Комбинацией могут быть два или несколько отдельных элемента, таких как две композиции или две совокупности, могут быть их смеси, такие как одна смесь двух или нескольких элементов, или любые их вариации. Элементы комбинации обычно функционально ассоциированы или связаны.

Использованный в настоящем документе термин набор представляет собой упакованную комбинацию, необязательно включающую другие элементы, такие как дополнительные реагенты и инструкции по применению комбинации или ее элементов. Наборы необязательно включают инструкции по применению.

Использованный в настоящем документе термин "заболевание или расстройство" относится к патологическому состоянию в организме, развившемуся по причине или в результате состояния, включая, но

не ограничиваясь ими, инфекции, приобретенные состояния, генетические состояния, и характеризующимся идентифицируемыми симптомами.

Использованный в настоящем документе термин "заболевание или расстройство, поддающееся лечению нуклеиновой кислотой" относится к любому заболеванию или расстройству, которое поддается лечению экзогенно доставляемой нуклеиновой кислотой за счет изменения (увеличения или уменьшения) экспрессии гена, ассоциированного или вовлеченного в этиологию заболевания или состояния, за счет экспрессии продукта гена для облегчения заболевания или состояния, или за счет замещения продукта гена, который является дефектным или отсутствует при заболевании или состоянии. Таким образом, заболевание или расстройство, поддающееся лечению нуклеиновой кислотой, предназначено для включения известных способов и применений генотерапии, в том числе, например, лечения генетически обусловленных дефицитов путем замещения дефектного или отсутствующего продукта гена или экзогенного введения терапевтического агента или продукта. Специалисту в данной области техники известны такие заболевания и расстройства. Примеры заболеваний и расстройств, поддающихся лечению нуклеиновой кислотой, описаны в настоящем документе.

Использованный в настоящем документе термин "лечение" субъекта с заболеванием или состоянием означает, что симптомы у субъекта частично или полностью устранены или остаются неизменными после лечения. Таким образом, лечение включает профилактику, терапию и/или излечение. Профилактика относится к предотвращению возможного заболевания и/или предотвращению усугубления симптомов или прогрессирования заболевания.

Использованный в настоящем документе термин лечение означает любой способ облегчения или иного благотворного изменения симптомов состояния, расстройства, или заболевания, или другого показателя.

Использованный в настоящем документе термин терапевтический эффект означает эффект в результате лечения субъекта, который изменяет, как правило, улучшает или облегчает симптомы заболевания или состояния, или который лечит заболевание или состояние. Терапевтически эффективное количество относится к такому количеству композиции, молекулы или соединения, которое приводит к терапевтическому эффекту после введения субъекту.

Использованный в настоящем документе термин облегчение симптомов конкретного заболевания или расстройства с помощью лечения, например, путем введения фармацевтической композиции или другого терапевтического агента относится к любому уменьшению, постоянному или временному, длительному или кратковременному, симптомов, которое может приписываться или может быть связано с введением композиции или терапевтического агента.

Использованные в настоящем документе термины предотвращение или профилактика относятся к способам снижения риска развития заболевания или состояния.

Использованный в настоящем документе термин эффективное количество представляет собой количество терапевтического агента, необходимое для предотвращения, лечения, облегчения, купирования или частичного купирования симптомов заболевания или расстройства.

Использованный в настоящем документе термин однократная доза относится к физически дискретным единицам, подходящим для человека и животных и упакованным по-отдельности, как известно в данной области техники.

Использованный в настоящем документе термин непосредственное введение означает введение без дополнительного разбавления.

Использованный в настоящем документе термин композиция для введения одной дозой (для однократного введения) относится к композиции для непосредственного введения.

Использованный в настоящем документе термин композиция для многократного введения относится к композиции для применения для повторных введений.

Использованный в настоящем документе термин "изделие" представляет собой продукт, который производится и продается. В рамках настоящего документа, термин предназначен для обозначения доставляемых агентов, таких как, частицы аденовирусов, содержащихся в готовых изделиях.

Использованные в настоящем документе термины в форме единственного числа охватывают множественное число, если из контекста явно не следует иное. Таким образом, например, ссылка на соединение, содержащее "внеклеточный домен" включает соединения с одним или множеством внеклеточных доменов.

Использованный в настоящем документе термин "или" используется для обозначения "и/или", если явно не используется для обозначения только альтернативы или если альтернативы не являются взаимоисключающими.

Использованные в настоящем документе диапазоны и количества могут быть выражены как "примерно" конкретное значение или диапазон. Примерно также включает точное количество. Таким образом, "примерно 5 оснований" означает "примерно 5 оснований", а также "5 оснований".

Использованные в настоящем документе термины "необязательный" или "необязательно" означают, что описанные далее события или обстоятельства происходят или не происходят, и что описание включает примеры, в которых указанное событие или обстоятельство происходит, и примеры, в которых они

не происходят. Например, необязательно замещенная группа означает, что группа является незамещенной или замещенной.

Использованные в настоящем документе аббревиатуры для любых защитных групп, аминокислот и других соединений, если не указано иное, соответствуют широко используемым, признанным аббревиатурам или IUPAC-IUB Комиссии по биохимической номенклатуре (см. (1972) *Biochem.* 11:1726).

Для ясности описания, а не в качестве ограничения, подробное описание разделено на следующие подразделы.

#### В. Доставка нуклеиновых кислот и генотерапия.

В настоящем документе предусмотрен способ доставки доставляемого агента (который представляет собой или который включает молекулу нуклеиновой кислоты) субъекту в орган или часть органа, который компартментализован от общего кровообращения путем сосудистой изоляции органа от системного кровообращения. В частности, в настоящем документе предусмотрены способы, основанные на обнаружении того, что можно получить устойчивую и стабильную экспрессию экзогенной доставляемой молекулы нуклеиновой кислоты при введении доставляемого агента (который представляет собой или который включает молекулу нуклеиновой кислоты) в орган или его часть, когда орган или его часть временно компартментализованы (т.е. лишены сосудов, или сосуды изолированы). Далее, в практике компартментализованного способа для доставки нуклеиновой кислоты достигнут линейный кинетический ответ на дозу, который ранее не достигался. Доставляемая молекула нуклеиновой кислоты может представлять собой терапевтическую нуклеиновую кислоту, в том числе нуклеиновую кислоту, которая кодирует терапевтический полипептид для субъекта. Таким образом, способы могут использоваться для клеточной экспрессии выбранного полипептида *in vivo*. В некоторых примерах полипептидный агент может использоваться в терапевтических целях, где полипептид лечит или облегчает расстройство или состояние у субъекта или иным образом улучшает качество жизни субъекта. В других примерах полипептидный агент может использоваться в сельскохозяйственных целях, например в применениях, которые улучшают качество или увеличивают количество производства мяса.

Описанный в настоящем документе способ имеет несколько преимуществ по сравнению с традиционными способами генотерапии благодаря отсутствию необходимости в системной инфузии вирусного вектора (тем самым снижая вирусную и иммунологические ответы), возможности значительно снизить количество вирусного вектора (тем самым снижая некроз в месте введения), возможности контролировать количество доставляемого агента, обеспечивая контроль экспрессии гена и обеспечивая устойчивую экспрессию выбранного агента.

#### 1. Существующие способы генотерапии.

Основной задачей биотехнологии является разработка подходов для доставки генетической информации в клетки *in vivo*. Целенаправленная доставка генетического материала в соматические клетки с целью лечения заболевания или для биомедицинских исследований была названа генотерапией. Генотерапия обещает стать значительным достижением в лечении заболеваний, в том числе соматических и наследственных генетических заболеваний. Чтобы добиться успеха, молекула нуклеиновой кислоты должна быть доставлена в терапевтически значительный процент пораженных клеток таким способом, который является и эффективным, и безопасным. Доставляемая молекула нуклеиновой кислоты может далее компенсировать отсутствующий или частично или полностью нефункциональный эндогенный ген, обеспечивать полезную функцию или блокировать доминантный негативный эндогенный ген или ген инфекционного организма.

В существующих способах генотерапии доставку молекул нуклеиновой кислоты в ткань или орган проводят внутривенно. Внутривенная доставка нуклеиновых кислот с использованием невирусных или вирусных векторов осложняется несколькими проблемами, что препятствует ее широкому применению. Например, системная доставка векторов нуклеиновых кислот может приводить к инициации иммунного ответа, что приводит к тяжелым токсическим побочным эффектам, нейтрализации продуктов трансгенов (например, из-за образования антител против экспрессированных белков), снижению поглощения клетками нуклеиновой кислоты или вектора, потере экспрессии гена и/или кратковременной экспрессии, требующей повторной инфузии, необходимости в больших дозах нуклеиновой кислоты для инъектирования в системное кровообращение субъекта, повреждению ткани, повышению давления в органе-мишени в процессе терапии, вирусности и/или сложности направленной доставки для специфичных типов клеток в организме. Эти проблемы могут быть тяжелее, если нуклеиновая кислота доставляется в вирусном векторе, таком как аденовирусный вектор. Кроме того, в существующих способах генотерапии отсутствует корреляция между дозой вектора и выходом белка.

Например, системное введение доставляемого агента, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты, такого как вирус, может приводить к трансдукции иммунных клеток и активации нежелательного иммунного ответа. Врожденные иммунные клетки, участвующие в первой линии защиты от чужеродной инфекции, в том числе фагоцитирующие клетки (например, макрофаги, нейтрофилы) и натуральные киллеры (NK), активируются под воздействием чужеродного материала (например, векторов на основе вирусов). Активация врожденного иммунного ответа происходит с целью ограничения инфекции путем убийства инфицированных клеток и путем секреции провоспалительных цитокинов и хемокинов (на-

пример, интерферонов, IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , MIP-2, MIP-1 $\alpha$ ). Цитокины и клеточный ответ ведут к повреждению ткани, апоптозу инфицированных клеток, вовлечению других эффекторных клеток, таких как дендритные клетки, и инициации адаптивного иммунного ответа. Антиген-презентирующие клетки (АПК), такие как незрелые дендритные клетки, присутствуют в крови и тканях, распознают и поглощают чужеродный антигенный материал, тем самым стимулируя путь передачи сигналов NF- $\kappa$ B, секрецию воспалительных цитокинов и хемокинов, и повышают уровень молекул, активирующих Т-клетки, таких как молекулы МНС и костимулирующие молекулы.

Результатом является активация клеточного и гуморального иммунного ответа. Гуморальный иммунитет может привести к образованию антител, которые напрямую связывают и инактивируют антиген (нейтрализующие антитела) или активируют другие клетки иммунной системы для разрушения антигена. Клеточный иммунитет опосредован цитотоксическими Т-клетками, которые распознают чужеродные пептиды на поверхности инфицированных клеток и при распознавании элиминируют любые клетки, продуцирующие чужеродный антиген. Таким образом, результатом иммунной активации является активация эффекторных клеток, таких как цитотоксические Т-клетки, которые элиминируют трансдуцированные клетки, а также образование антител, секретируемых плазматическими клетками, которые продуцируют нейтрализующие антитела, предотвращающие повторное введение нуклеиновой кислоты (например, вирусного вектора). Кульминация иммунного ответа и степень такого ответа может вызвать системную и локальную токсичность.

Эта токсичность также может быть усилена, когда доставка является распространенной, когда несколько тканей или органов становятся трансдуцированными нуклеиновой кислотой. Тогда как для ограничения локализованной токсичности такие ткани или органы могут быть вырезаны, в тех случаях, когда вовлечены несколько органов, имеющие множество участков трансдукции, может быть невозможно лечить любые побочные эффекты удалением трансдуцированной ткани. Даже когда доставка нуклеиновой кислоты осуществляется направленно в сосудистую систему органа-мишени, могут возникнуть нежелательный иммунный ответ и токсичность. Также целый орган может подвергнуться токсическим эффектам.

Системное введение требует более высоких доз, чтобы достичь достаточной эффективности трансдукции клеток и обеспечить эффективный перенос генов. Например, для вирусной доставки, такой как введение аденовирусных векторов, вводят  $10^{10}$ - $10^{13}$  вирусных частиц (vp) на кг (vp/kg), и обычно от  $10^{12}$  до  $10^{13}$  vp/kg, чтобы достичь измеряемой и воспроизводимой клеточной трансдукции и экспрессии в участке ткани, такой как трансдукция гепатоцитов и экспрессия в печени. Требуются более высокие дозы, потому что вектор удаляется из крови за счет иммунного ответа до достижения клеток ткани, таких как гепатоциты печени. При более высоких дозах фагоцитирующие клетки крови и ткани (например, купферовские клетки) насыщаются, что позволяет обеспечить высокий уровень трансдукции гепатоцитов. Также системная доставка нуклеиновых кислот может приводить к доставке и распределению по всему телу, что не является идеальной ситуацией, если получаемый терапевтический эффект нужен только в целевом локусе. В таких случаях часто бывает необходимо увеличить дозу, чтобы достичь терапевтической эффективности. Увеличение дозы, тем не менее, увеличивает вероятность нежелательной токсичности или других побочных эффектов.

Предпринимались другие попытки локализовать доставку в орган или его часть, чтобы избежать некоторых таких проблем, но ни одна не была успешной в преодолении всех этих осложнений. Например, способы направленной доставки вирусных векторов (например, лентивируса или аденовируса) в печень путем изолированной внутривенной перфузии или перфузии печеночной артерии после окклюзии печеночной вены или артерии приводят к повышению уровня ферментов печени, цитокинов, некоторой инфильтрации лимфоцитами и/или контаминации нецелевых органов или частей органов (см., например, патентные заявки США №№ US2008/0025952, US2010/0010068 и US2006/0188482; Kinoshita et al. (2010) *J Surg. Res.*, 160:47-51). Способы гидродинамической доставки генов в печень путем внутривенной доставки нуклеиновой кислоты, которые образуют "поры" в плазматической мембране окружающих клеток паренхимы для осуществления доставки в паренхимные клетки, также могут привести к контаминации других органов. Такие способы не являются эффективными для всех видов и до сих пор не показано их применение для вирусных векторов (Fabre et al. (2008) *Gene Ther.*, 15:452-62). Далее, было показано, что гидродинамические способы доставки гена, чтобы быть эффективными, требуют обструкции оттока, так что эти инвазивные методы не пригодны для клинической практики (Sawyer et al. (2010) *Gen Ther.*, 17:560-4). Другие способы, которые, прежде всего, основаны на непосредственном введении в паренхиму и инъекции в печень нуклеиновой кислоты, могут приводить к повышению уровня ферментов печени, повышению уровня цитокинов и/или контаминации других органов или их частей (см., например, Crettaz et al. (2006) *Hepatology*, 44:623-32; Fumoto et al. (2009) *Biol. Pharm. Bull.*, 32:1298-302).

## 2. Доставка непосредственно в компартиментализованную ткань или орган.

В настоящем документе предусмотрены компартиментализованные способы для доставки молекулы нуклеиновой кислоты путем введения доставляемого агента непосредственно в клетки в органе или части органа, который компартиментализован путем изоляции от сосудистой системы, лимфатической сис-

темы и/или протоков. В способах в настоящем документе способ характеризуется 1) блокированием потока крови в орган и или его часть из органа или его части для предотвращения или для предотвращения в значительной степени связи с общей системой кровообращения; 2) прямым введением доставляемого агента в паренхимные клетки ткани или их часть и 3) поддержанием сосудистой изоляции на протяжении периода времени, достаточного для осуществления поглощения клетками выбранного агента. Эффект этих аспектов заключается в том, что доставляемый агент, такой как вирусный вектор, не попадает в системное кровообращение, так что не происходит инициации системного иммунного ответа, устраняется системная токсичность и не происходит контаминации других нецелевых органов или тканей. Далее, путем непосредственного введения доставляемого агента в паренхимные клетки компартментализованной ткани или органа максимизируется поглощение клетками. Максимизированное поглощение клетками агента означает, что при снятии компартментализации ткани или органа практически все доставляемые молекулы нуклеиновых кислот доступны для экспрессии трансгена в клетке, и количество доставляемого агента, которое может попадать в системное кровообращение, уменьшено или устранено. Таким образом, предусмотренные в настоящем документе способы позволяют использовать в качестве мишени только нужные клетки в органе-мишени и осуществлять экспрессию продукта трансгена на протяжении продолжительного периода времени.

Данный способ в настоящем документе основан на обнаружении того, что доставка нуклеиновых кислот в ткань или орган, компартментализованные на время, выбранное как подходящее для нужного органа-мишени, обеспечивает устойчивую экспрессию доставляемой молекулы нуклеиновой кислоты, которая намного продолжительнее экспрессии, достигаемой при использовании способов, доступных в предшествующем уровне техники; снижает количество доставляемого агента, которое должно быть введено, чтобы вызвать заметное поглощение и экспрессию молекулы нуклеиновой кислоты; позволяет избежать побочных эффектов, связанных с системным введением доставляемого агента, такого как вирусный вектор, или генетически модифицированная клетка; и впервые обеспечивает возможность регулировать количество экспрессируемого полипептида путем регулирования количества доставляемого агента, вводимого субъекту. Изобретение обеспечивает значительные улучшения, которые создают новые возможности в области генотерапии.

Раскрытые здесь способы доставки молекулы нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид, создают преимущество перед способами непосредственного введения полипептида. Например, благодаря тому, что экспрессия полученного кодируемого полипептида является устойчивой, доставка молекулы нуклеиновой кислоты субъекту не обязательно требует повторных инфузий или инъекций на протяжении курса лечения. Дополнительно, благодаря тому, что в способах по настоящему документу полипептид экспрессируется собственными трансдуцированными клетками субъекта (например, гепатоцитами), кодируемые полипептиды правильно посттрансляционно модифицируются.

Кроме того, доставка гена в индивидуальные доли или сегменты органа, такого как печень, имеет преимущества. Например, региональная доставка означает, что любые неожиданные вредные эффекты от доставки гена будут либо не иметь последствий, либо могут быть легко вылечены путем удаления целевой доли. В данном способе компартментализация для доставки делает возможным использовать нецелевые части ткани или органа в качестве внутреннего контроля. Она также позволяет удалять целевую долю, тем самым обеспечивая формальное доказательство того, что доставка гена в целевую долю была ответственна за эффект.

Эти признаки данного способа проиллюстрированы в настоящем документе в качестве примера на прямом введении в печень аденовирусного доставляемого агента, содержащего гетерологичную молекулу нуклеиновой кислоты. Результаты в настоящем документе демонстрируют, что непосредственное введение аденовируса к интерстициальным паренхимным клеткам доли печени при сосудистой изоляции или компартментализации путем зажимания паренхимы на время, достаточное для осуществления поглощения клетками практически всех вводимых аденовирусов, обладает многочисленными преимуществами по сравнению с существующими способами. В частности, наблюдалась более высокая эффективность трансдукции в печени по сравнению с системным инъецированием. Используя этот подход, была достигнута устойчивая и стойкая экспрессия гена без иммуносупрессии, наблюдались высокие уровни синтеза белка и низкие дозы вводимого вируса менее  $10^{11}$  частиц, например меньше чем  $10^{10}$  частиц,  $10^9$  частиц,  $10^8$  частиц,  $10^7$  частиц,  $10^6$  частиц,  $10^5$  частиц,  $10^4$  частиц,  $10^3$  частиц, или меньше были достаточны и эффективны для получения экспрессии трансгена на высоком уровне в целевой доле или области. В частности, результаты в настоящем документе демонстрируют, что при сохранении выхода белка требуется меньше вируса. Результат также показывает, что существует корреляция между дозой вектора и выходом белка. Например, при использовании настоящего способа введения с компартментализацией меньшее количество вирусного вектора (например, меньше чем  $10^{10}$  частиц, и всего лишь  $10^3$  частиц,  $10^2$  частиц или меньше) приводит к экспрессии полипептида, с положительной корреляцией между количеством вводимого вирусного вектора и степенью экспрессии. Также, в практике данного способа не наблюдались побочные эффекты, такие как вирусемия, воспалительный ответ в печени, экспрессия цитокинов в печени, общее повреждение печени и некроз в месте введения, а также системная токсичность. Принимая во внимание нетоксичность и продолжительную экспрессию трансгена, этот подход можно

использовать для применения в генотерапии путем достижения экспрессии трансгена в печени для лечения заболеваний печени или других заболеваний у субъектов млекопитающих, в том числе, у людей.

Следующие разделы описывают более подробно стадии способа компартментализации для доставки нуклеиновых кислот, как предусмотрено в настоящем документе, и примеры доставляемых агентов и композиций для применения в осуществлении способа. Понятно, что описание дополнительных стадий или альтернативных стадий, которые можно осуществить в способе, предусмотрены как осуществимые с любыми конкретными стадиями или комбинациями стадий раскрытых способов, и что такие комбинации или наборы комбинаций специально предусмотрены в настоящем документе. Также ниже описаны способы и применения способа компартментализованной доставки для применения для экспрессии молекул нуклеиновых кислот, кодирующих полипептиды для терапевтических, промышленных, ветеринарных или сельскохозяйственных применений. Различные стадии и реагенты, используемые в способе, в том числе орган-мишень и доставляемый агент, могут быть адаптированы специалистом в данной области техники, основываясь на описании в настоящем документе, для применения в любом подлежащем лечению органе или его части в зависимости от доставляемого агента, конкретного применения или терапевтического показания и конкретного субъекта, а также других аналогичных соображений.

С. Компартментализованный способ (способ с разделением) для доставки нуклеиновых кислот.

В настоящем документе предусмотрен способ доставки молекулы нуклеиновой кислоты путем введения выбранного доставляемого агента субъекту, включающий стадии (1) компартментализации ткани, органа или его части путем изоляции или почти полной изоляции от сосудистой системы, лимфатической системы и/или системы протоков; (2) введения выбранного доставляемого агента непосредственно в компартментализованный орган или его часть; (3) поддержания компартментализации на протяжении периода времени, достаточного для введения доставляемого агента перед снятием изоляции, например восстановлением кровообращения через сосуды с органом или его частью. В данном способе компартментализация ткани или органа, или его части поддерживается на протяжении периода времени, достаточного для введения нуклеинового агента, так что меньше чем 10% доставляемого агента попадает в системное кровообращение, и/или так, что поглощение доставляемого агента клетками органа или его части составляет больше чем 80% выбранного доставляемого агента. Способ, предусмотренный в настоящем документе, делает возможным устойчивую экспрессию продукта трансгена в ткани или органе, или его части на протяжении более 60, более 90 дней, более 6, более 9 месяцев или более одного года.

В практике способа в настоящем документе до и после дозирования доставляемого агента, такого как вирусный вектор, чтобы минимизировать или снизить возможность иммунного ответа субъекту необязательно могут вводиться иммуносупрессивные агенты. Например, могут вводиться агенты, которые супрессируют цитотоксические лимфоциты. Примеры иммуносупрессивных агентов включают, но не ограничиваются ими, циклоспорин (neoral®, Sandimmune®), преднизон (Novo Prednisone®, Apo Prednisone®), азатиоприн (Imuran®), такролимус или FK506 (Prograf®), микофенолят мофетила (CellCept®), сиролимус (Rapamune®), ОКТ3 (Muromonab CO3®, Orthoclone®), ATGAM или антитимоцитарный глобулин. Определение того, требуется ли иммуносупрессивный агент, находится в пределах компетентности лечащего врача. Эффективные иммуносупрессивные режимы рутинно практикуются в данной области техники, и конкретный режим будет зависеть от факторов, которые включают, например, конкретный орган-мишень, конкретный доставляемый агент, конкретную генетическую терапию и субъект, подвергающийся лечению.

Предусмотренный в настоящем документе способ доставки нуклеиновых кислот можно осуществить на любых субъектах млекопитающих. Примеры таких субъектов включают, но не ограничиваются ими, мышей, крыс, коров, свиней, овец, коз, лошадей и людей. В частности, предусмотренные здесь способы осуществляют на субъектах, которые являются людьми. В частности, способы можно осуществить на субъекте человеке, который является ребенком до 18 лет, например младенцах, детях ясельного и младшего возраста. В некоторых примерах способ можно осуществить в утробе на плоде. Поскольку способ, предусмотренный в настоящем документе, обеспечивает устойчивую и продолжительную экспрессию продукта трансгена на высоком уровне, данный способ можно использовать для разнообразных применений, включая, но не ограничиваясь ими, для медицинских применений, в том числе для замены дефектного продукта гена или для экзогенного введения терапевтического агента; для получения органов для трансплантации; для получения терапевтических белков в трансгенных животных (например, биореакторы) и для сельскохозяйственных или ветеринарных применений, а также для промышленных применений.

Предусмотренные в настоящем документе компартментализованные способы для доставки нуклеиновых кислот субъекту могут быть осуществлены один раз или могут осуществляться множество раз. Например, способ, предусмотренный в настоящем документе, можно осуществлять множество раз на протяжении протокола продукции белка или на протяжении схемы лечения. В некоторых примерах, как описано в настоящем документе, способ повторяют, чтобы осуществить доставку в несколько локусов-мишеней, особенно где требуются высокие уровни трансдукции или экспрессии в ткани или органе. В таких примерах способ обычно повторяют в течение минут, часов или дней после первого применения

способа. В других примерах способ можно повторить в течение недель, месяцев или лет после первого применения. Могут быть добавлены схемы с увеличением дозы, если того требует патология. В примерах, где способ повторяют для того же самого локуса-мишени, предусмотрен достаточный период времени, чтобы ткань или орган восстановились после предыдущей сосудистой изоляции. В других примерах, где способ повторяют, способ осуществляют для целевой ткани, органа или области, которые ранее не подвергались сосудистой изоляции.

Описание стадий данного способа и различные не ограничивающие примеры его вариантов воплощения предусмотрены в нижеследующих подразделах.

#### 1. Компартиментализация ткани или органа.

На первой стадии способа, предусмотренного в настоящем документе, ткань, орган или его часть компартиментализуют путем изоляции от сосудистой системы. В некоторых примерах компартиментализация также дополнительно достигается путем изоляции от системы протоков и/или лимфатической системы. Начало компартиментализации предшествует введению выбранного агента, и компартиментализация не снимается или не прекращается для восстановления кровообращения через сосуды с органом или его частью, пока не пройдет период времени, достаточный для осуществления поглощения клетками выбранного агента.

В компартиментализованном способе в настоящем документе для доставки нуклеиновых кислот можно использовать любую ткань или орган, или его часть. Такие ткани или органы включают, но не ограничиваются ими, печень, легкие, ЦНС (головной или спинной мозг), периферическая нервная система (например, нервы), поджелудочная железа, желчный пузырь, эндокринные железы (гипофиз, надпочечники, щитовидная железа и т.п.), сердечно-сосудистые органы (например, сердце и кровеносные сосуды), кожа, урогенитальные органы (почки, матка, шейка матки, простата, мочеиспускательный канал), органы дыхательной системы (например, легкие или дыхательные пути), кости, мышцы и кишечник. Этот список не является исчерпывающим, так специалисту в данной области техники будут понятны дополнительные органы-мишени и их доли. В конкретных примерах ткань или орган, или его часть для применения в компартиментализованном способе в настоящем документе представляют собой печень или ее часть.

Обычно тканью, или органом, или его частью, которые компартиментализуют, являются такие ткань, или орган, или их часть, которые толерантны к сосудистой изоляции на протяжении достаточного периода времени, такого, чтобы меньше чем 10% и обычно меньше 5, 4, 3, 2, 1% или меньше доставляемого агента попадало в системное кровообращение. Обычно этот заранее установленный период времени представляет собой такой период времени, что практически весь доставляемый агент поглощается клетками ткани, например по меньшей мере 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или больше доставляемого агента поглощается клетками ткани. Заранее установленный период времени, который обеспечивает поглощение клетками ткани и предотвращает высвобождение или попадание агента в системное кровообращение, зависит от конкретного органа или его части, конкретного доставляемого агента и особенностей непосредственной доставки в клетки ткани (например, применение электропорации). Определение опытным путем необходимого периода времени, так что меньше 10% доставляемого агента попадает в системное кровообращение, находится в пределах компетентности специалиста в данной области техники. Например, в предусмотренном здесь разделе F описаны примеры анализов и способов оценки доставки доставляемого агента. В конкретных примерах в настоящем документе компартиментализация органа или его части поддерживается на протяжении по меньшей мере 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 или 60 мин или больше. Обычно компартиментализация продолжается по меньшей мере 20 мин, но не дольше 60 мин. Например, компартиментализация органа или его части, такого как печень или ее часть, продолжается по меньшей мере 30 мин и обычно не дольше 60 мин. Таким образом, в зависимости от конкретного доставляемого агента, компартиментализация поддерживается при условиях, которые могут привести к ишемии органа, ткани или его части на короткий период времени. Таким образом, орган или его часть, используемые в способах в настоящем документе, представляют собой такой орган или его часть, которые толерантны к коротким периодам ишемии.

Начало компартиментализации предшествует введению выбранного агента. В способах в настоящем документе, компартиментализацию начинают непосредственно перед доставкой доставляемого агента в ткань. Например, компартиментализацию начинают не больше чем за 5 мин перед доставкой доставляемого агента и, как правило, не больше чем за 4, 3, 2, 1 мин или 30 с перед доставкой доставляемого агента. В конкретных примерах устройство, используемое для осуществления сосудистой изоляции, может быть приспособлено или модифицировано, или сделано таким образом, чтобы быть совместимым с устройством доставки для обеспечения более быстрой или более эффективной доставки доставляемого агента после сосудистой изоляции.

В предусмотренных в настоящем документе способах введения выбранного доставляемого агента в орган или его часть у субъекта способы включают стадии снижения, блокирования или изолирования кровотока через орган или его часть или прекращения иным образом доступа или связи ткани или органа, или его части с кровообращением. Это можно достичь путем изоляции ткани или органа, или его части от сосудистой системы, системы протоков и/или лимфатической системы. Изоляцию можно осуществ-

вить в течение заранее установленного времени. Как правило, компартиментализацию осуществляют способами, с помощью которых достигается полная сосудистая изоляция в течение заранее установленного времени. Ткань или орган или его часть могут быть компартиментализованы любым количеством способов. В одном из примеров можно достичь изоляции, используя один или несколько артериальных или венозных зажимов, окклюзионные катетеры или с помощью сосудистых сшивающих устройств для закупорки индивидуальных вен или артерий. Как правило, для блокирования кровотока артерии и вены или протоки, обслуживающие орган или его часть, пережимают. В других примерах сосудистую изоляцию можно осуществить, используя один или несколько зажимов для паренхимы или сосудистой ножки для прекращения кровоснабжения и потока крови через ткань. Для достаточно изолированного органа или его части, имеющего единственный источник кровоснабжения (например, артерии и сосуды, снабжающие орган или его часть находятся в сосудистой ножке, которая может быть пережата) достаточно использовать единственный зажим или окклюзионный катетер. В других органах или их частях со сложной сосудистой системой или с коллатеральной циркуляцией, может потребоваться несколько зажимов или окклюзионных катетеров. Способы изоляции ткани или ее части от сосудистой системы хорошо известны в данной области техники, и используются в различных медицинских процедурах, таких как резекция и рассечение ткани.

Способы достижения компартиментализации ткани или органа могут включать селективные или не-селективные способы блокирования кровотока через орган или его часть. Например, можно осуществить селективное зажатие доли, секции или сегмента органа, такого как печень. Преимущество селективного зажатия состоит в том, что ишемическое повреждение может быть ограничено, если оно вообще происходит, выбранной областью, которая компартиментализуется (Chouillard et al. (2010) *Annals of Surgical Innovation and Research*, 4:2).

В конкретных примерах компартиментализацию осуществляют путем паренхимной компрессии. Например, можно осуществить ручную компрессию, например, используя методику разделения пальцами. В дополнительных примерах, к области или части органа можно применить жгут, кабель или бандаж. В других примерах можно использовать зажим для паренхимы для компрессии кровеносных сосудов, артерий, протоков или лимфатических сосудов и блокирования кровотока в области, доле, секции или сегменте ткани или органа. Такие зажимы включают зажимы для сосудистой ножки и другие зажимы, которые могут селективно зажать область или сегмент органа. Зажимы для применения в способах сосудистой изоляции хорошо известны и доступны специалисту в данной области техники. Они включают коммерчески доступные зажимы от производителей, таких как, Aesculap (Center Valley, PA), Klein Surgical Systems (San Antonio, TX) или Karl Storz (Germany). Примеры зажимов включают, но не ограничиваются ими, зажим Келли, микрососудистый зажим, зажим бульдог, зажим Дебейки-Сатинского, зажим Лонгмайра, зажим для печени Lin или Chu или зажим для печени Inokuchi. Также могут применяться зажимы с надувными баллонами. Выбор и размер зажима зависит от конкретного субъекта, размера субъекта, используемого хирургического способа и конкретного органа или его части, который должен быть компартиментализован способом по настоящему документу. Определение опытным путем и выбор зажима, который совместим с конкретным применением, находится в пределах компетентности специалиста в данной области техники.

В примерах паренхимной компрессии в настоящем документе давление, которое создается на паренхимную ткань, достаточно для остановки кровотока, но оно не такое высокое, чтобы вызвать серьезное повреждение окружающей ткани. Определение идеального давления, чтобы достичь оптимальной компартиментализации органа или его части и при этом минимизировать повреждение ткани или травму, находится в пределах компетентности специалиста в данной области техники, такого как квалифицированный хирург. Обычно зажим является таким зажимом, который может создать равномерное давление во всех дистальных, средних и проксимальных положениях зубчатого края зажима. Зажим и создаваемое давление также должны быть достаточными для компартиментализации области или сегмента ткани или органа от соседних областей тканей и от окружающей сосудистой системы. Эта компартиментализация должна поддерживаться в течение всего времени его применения и обычно по меньшей мере от 30 до 60 мин. Если желательно, силу зажима можно определить, используя методики, известные в данной области техники, например, с использованием динамометрического преобразователя, работающего на сжатие, например, динамометрического преобразователя, работающего на сжатие, дискового типа, 2.2. (Interface Advanced Force Measurement; Scottsdale, Az). Также, давление в мм Hg, необходимое для достижения компартиментализации (давление утечки), можно определить *ex vivo* или *in vivo*, используя измеритель давления, такой как цифровое устройство для измерения давления Cole Parmer (например, Cole-Parmer®; Vernon Hills, IL).

Компартиментализацию можно оценить с помощью инъекций красителя, такого как метиленовый синий или бромфеноловый синий или другой аналогичный краситель, в компартиментализованную область-мишень или сегмент-мишень и оценки его локализации в этой области. Например, после удаления зажима ткань с двух сторон от места наложения зажима можно вырезать и проанализировать на присутствие красителя. Компартиментализация достигается, когда краситель не проникает из части или области изолированной ткани. Понятно, что некоторая утечка красителя (свидетельствующая о кровотоке) может

произойти в периферических областях вокруг границы зажима, при условии, что имеется область или часть ткани, которая изолирована от сосудистой системы на протяжении всего периода паренхимной компрессии. Идеально достигается такая компартиментализация, что краситель не проникает в соседние ткани за пределами границ зажима. Это проиллюстрировано в примере 6.

В дополнение к зажимам и окклюзионным катетерам, можно использовать отсос для снижения или прекращения кровотока в органе или его части. В следующих примерах, для разбавления крови и для дальнейшей минимизации попадания доставляемого агента в кровообращение можно использовать промывание для перфузии или частичной перфузии изолированного органа или ткани. Промывание можно осуществить, используя любой физиологически приемлемый раствор, такой как солевой раствор. Отсос или промывание можно осуществить перед введением или доставкой доставляемого агента. Кроме того, в примерах способов в настоящем документе для помощи в осуществлении стадии компартиментализации органа или его части от системного кровообращения можно использовать устройства для визуализации, такие как ультразвукография, компьютерная томография или получение изображений методом ядерного магнитного резонанса. В одном из примеров можно использовать интраоперационную ультразвукографию для локализации сосудистых паттернов и других анатомических свойств ткани или органа, чтобы помочь блокировать кровоток.

В некоторых примерах перед полной сосудистой изоляцией в течение заранее установленного времени, которая, вероятно, приведет к длительной ишемии, можно провести ишемическое прекондиционирование (IP). Прекондиционирование приводит к повышению толерантности органа или его части к более длительным периодам ишемии, которые могут случаться при практическом применении способа по настоящему документу, чтобы обеспечить проникновение доставляемого агента в клетки ткани. В таких способах кровотоков в ткани или ее части блокируют на такое время, которое меньше заранее установленного времени для сосудистой изоляции в способе в настоящем документе, но которое приводит к слабой, умеренной или средней ишемии. Например, ткань или орган прекондиционируют путем блокирования кровотока на время по меньшей мере или на время до 2, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30 мин или больше. Далее, ткань или орган немедленно подвергают реперфузии в течение 10 мин для получения состояния устойчивого ишемического-реперфузионного повреждения. Реперфузия длится в течение по меньшей мере или длится в течение до 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20 мин или больше. Непосредственно после прекондиционирования, характеризующегося периодом ишемии от мягкой до средней и последующей реперфузии, орган или его часть подвергают компартиментализации, используя любой из способов в настоящем документе, в течение достаточного заранее установленного времени, чтобы доставляемый агент проник в клетки ткани, как описано в настоящем документе.

В других примерах способа в настоящем документе, в которых орган или его часть особенно чувствительны к гипоксии или аноксии, орган или его часть компартиментализуют, обеспечивая экстракорпоральную перфузию органа или его части. Этот способ используется, например, в коронарном шунтировании, при котором поддерживается системное кровообращение. В способах в настоящем документе может использоваться экстракорпоральная перфузия для поддержания кровотока в закрытой системе в органе мишени или его части. Также, экстракорпоральная перфузия может включать насыщение крови кислородом.

Способы блокирования кровотока для осуществления компартиментализации органа или его части можно осуществить с помощью обычных хирургических операций, известных в данной области техники, в том числе, с помощью открытых хирургических операций или лапароскопическими методами.

Выше описанные способы компартиментализации органа, например, путем сосудистой изоляции от системного кровообращения, можно осуществить для любого органа или его части. Примеры таких органов включают, но не ограничиваются ими, печень, почки, поджелудочную железу, легкие или селезенку, или их части. В нижеследующих подразделах приведены примеры проведения сосудистой изоляции для органов, приведенных в качестве примера.

#### а. Печень.

У человека и других животных печень представляет собой красновато-коричневый дольчатый орган. Печень имеет широкий спектр функций, в том числе детоксикацию, синтез белков и продукцию биохимических веществ, необходимых для пищеварения. Печень является особенно хорошим органом-мишенью для доставки доставляемого агента с использованием способов по настоящему документу по нескольким причинам. Это самый большой орган тела (от 2 до 3% общей массы тела), который имеет по меньшей мере одну легкодоступную долю, которая может быть компартиментализована, имеет довольно медленный клеточный обмен, секретирует белки и толерантен к аноксии и гипоксии в течение продолжительных периодов времени. Кроме того, печень является важным органом-мишенью для доставки молекул нуклеиновых кислот, потому что она играет ключевую роль в метаболизме и продукции белков сыворотки крови. Существует большое число известных заболеваний, некоторые из которых вызваны дефектами специфических для печени продуктов генов, в случае которых продукция в печени секретируемого или внутриклеточного белка может привести к положительному результату. Они включают, например, семейную гиперхолестеринемия, гемофилию, болезнь Гоше и Фабри и расстройство цикла образования мочевины, а также заболевания накопления гликогена. Тем не менее, несмотря на эти преимуще-

ства, направленная доставка нуклеиновых кислот в печень затруднена из-за невозможности достичь продолжительной экспрессии гена доставляемой нуклеиновой кислоты.

Печень находится в верхнем правом квадранте брюшной полости непосредственно под диафрагмой. Это хорошо кровоснабжаемая структура. Кровоснабжение осуществляется по двум приносящим потокам через портальную вену и печеночную артерию, и через один выносящий поток через печеночные вены, которые сливаются в печеночные вены, впадающие в верхнюю полую вену. В результате такого двойного приносящего кровоснабжения скорость кровотока составляет 1500 мл/мин, 75% которого обеспечивается портальной веной и 25% обеспечивается печеночной артерией (Abdalla et al. (2004) Surg. Clin. N. Am., 84:563-585). На фиг. 1 область А изображена анатомическая и сосудистая организация печени крысы. После того как портальная вена входит в печень, она разделяется на правые и левые ветви для снабжения разных долей. Первая ветвь продолжается вправо в виде правой нижней портальной вены и правой верхней портальной вены для снабжения правой доли. Вторая ветвь продолжается влево в виде хвостовой портальной вены, которая распадается на две вены: верхнюю хвостовую ветвь и нижнюю хвостовую ветвь. Портальная вена продолжается до своей основной бифуркации, давая правую среднюю портальную вену, которая снабжает правую часть средней доли, и левую портальную вену, которая в свою очередь дает левую среднюю портальную вену и левую латеральную портальную вену, снабжая соответствующие доли. Артериальное снабжение печени обеспечивается печеночной артерией, которая, после того, как входит в печень, разделяется на правую и левую ветви для снабжения долей и далее разделяется так же, как портальные вены.

Согласно традиционной макроскопической анатомии печень делится на четыре доли на основании свойств поверхности. С передней стороны серповидная связка делит печень на левую анатомическую долю и правую анатомическую долю. Если печень перевернуть на висцеральную поверхность, то можно увидеть еще две дополнительные доли между правой долей и левой долей, которые называются хвостовой долей и квадратной долей.

Дальнейшие деления возможны на основании функциональных/сосудистых особенностей печени (фиг. 1, область В). Три главные печеночные вены (правая печеночная вена, средняя печеночная вена и левая печеночная вена) разделяют печень человека на четыре секции или сегмента (правый задний сегмент, правый передний сегмент, левый средний сегмент и левый латеральный сегмент), каждый из которых снабжается соответствующей ветвью портальной системы. Дальнейшее разветвление портальных вен подразделяет печень человека на восемь анатомически независимых подсегментов, каждый со своей собственной выносящей печеночной венозной системой, приносящей портальной венозной системой, приносящей артериальной системой и системой желчных протоков. Подсегменты I и IV соответствуют левому среднему сегменту, подсегменты II и III соответствуют левому латеральному сегменту, подсегменты V и VIII соответствуют правому переднему сегменту и подсегменты VI и VII соответствуют правому заднему сегменту.

Паренхима печени разделена соединительной тканью капсул (называемых капсулами Глиссона), которая образует перегородки в печени, разделяющие ее на маленькие единицы, называемые дольками. Эта паренхима пересекается кровеносными сосудами, лимфатическими сосудами и желчными протоками. Каждая долька содержит гексагонально расположенные гепатоциты, которые образуют стопки или пластины, толщиной в одну или две клетки, радиально отходящие наружу в направлении от центральной вены. Пластины клеток разделены системой синусоидов. Гепатоциты имеют среднюю продолжительность жизни примерно пять месяцев. Эти клетки также способны к здоровой регенерации, когда вещество печени утрачивается. На вершине дольки печени находится портальный тракт, содержащий желчный проток и терминальную ветвь печеночной артерии и портальной вены (междольчатые сосуды). Сосуды, берущие начало от междольчатых сосудов, распределяются по периферии дольки, что обеспечивает кровоток во входные сосуды в синусоиды и в направлении центральной вены.

В предусмотренных в настоящем документе способах, компартиментализацию печени или ее доли, области или сегмента можно осуществить путем изоляции печени или ее доли или сегмента от связи с системным кровообращением, например, путем изоляции от сосудистой системы, системы протоков или лимфатической системы. Способы осуществления компартиментализации включают процедуры наложения сосудистого зажима и/или зажима на паренхиму. Способы осуществления сосудистой изоляции и окклюзии печени хорошо известны в данной области техники (см., например, Buell et al. (2001) Arch. Surg., 136:569-575; Belghiti et al. (1999) Annals of Surgery, 229:369-375; Chowdhury (2010) BSMMU J., 3:112-119; Chouillard et al. (2010) Annals of Surgical Innovation and Research, 4:2-12; Chaib et al. (2003) Arq. Gastronenterol., 40:131; Abdalla et al. (2004) Surg. Clin. N. Am., 84:563-585). Такие способы включают, но не ограничиваются ими, печеночную сосудистую изоляцию, сосудистую окклюзию доли печени, наложение зажима на сосудистую ножку, сегментарную сосудистую окклюзию, полную сосудистую изоляцию и печеночную сосудистую изоляцию с перекрытием кровотока через полую вену.

В примерах способа в настоящем документе, компартиментализацию сегмента или части печени можно осуществить способами, которые приводят к компрессии паренхимы. Например, можно осуществить ручную компрессию, например, используя разделение пальцами, при котором паренхима печени сдавливается между большим пальцем и одним из пальцев. В другом примере используется зажатие со-

судистой ножки либо путем компрессии сосудистой ножки пальцами, либо с использованием зажима или другого аналогичного устройства, с помощью которого можно создать давление на сосудистую ножку. В следующем примере компартиментализацию можно осуществить наложением на долю зажима для компрессии паренхимы или окклюзионного зажима. Примеры зажимов, которые можно использовать для паренхимной компрессии доли печени, включают, но не ограничиваются ими, зажим Лонгмайра-Сторма (V. Mueller, Stainliss, Germany, номер по каталогу SU-9080), зажим для печени Lin или Chu (Pilling номер по каталогу 604113-61995), зажим для печени Inokuchi (Kanematsu et al. (1984) Jpn. J. Surg., 14:432-3), зажим Doty (патент № 3667471) и зажим Vernick (патент США № 5203786). В некоторых примерах дальнейшую сегментарную сосудистую изоляцию можно осуществить, помещая меньший объем паренхимы между концами зажима.

Как правило, в практике способа по настоящему документу можно мобилизовать долю от других долей, чтобы селективно компартиментализовать область или часть печени. Мобилизация позволяет получить доступ к доле или области, чтобы осуществить паренхимную компрессию или зажатие. Возможность мобилизовать только часть или область печени также означает, что существуют способы достижения селективной доставки доставляемого агента. Благодаря сегментарной анатомии печени в виде автономных единиц, можно достичь компартиментализации определенной доли, сегмента или их части при сохранении кровотока в другие сегменты. Например, для достижения компартиментализации области или сегмента можно осуществить селективное сжатие или окклюзию сосудистой ножки, каждой сосудистой ножки сегмента или паренхимной области. Мобилизация может требовать разделения ассоциированных связок и/или других ассоциированных желез. Процедуры и методы мобилизации или изоляции различных долей или сегментов печени хорошо известны специалисту в данной области техники. Например, хвостовая доля, левая доля или левая средняя доля достаточно сосудисто изолированы и доступны. Различия в анатомии печени между видами млекопитающих может сделать конкретную область или долю у некоторого вида более пригодной для изоляции, чем другая. Специалист в данной области техники сможет определить соответствующие доли в других животных, и сможет определить долю или сегмент, подходящие для мобилизации или изоляции для компартиментализации с использованием способов по настоящему документу.

В конкретных примерах в настоящем документе компартиментализованы хвостовая доля, левая доля или левая средняя доля, или их части. При необходимости, можно осуществить отвод и рассечение доли или сегмента печени от окружающих связок, чтобы обеспечить доступ к области, которая может быть правильно компартиментализована от сосудистой системы без повреждения или воздействия на другие области или органы, или окружающие структуры. Например, хвостовая доля располагается позади сегмента IV и тесно связана с нижней полой веной и портальной веной. Мобилизацию хвостовой доли можно осуществить путем разделения малого сальника и дорсальной связки хвостовой доли печени с поллой веной. Левая доля печени может быть мобилизована путем разделения левой треугольной связки. Аналогичные процедуры можно использовать для мобилизации соответствующей доли у человека или другого субъекта.

После того как печень, ее область, доля или сегмент компартиментализованы, доставляемый агент может быть доставлен в компартиментализованную долю, область или сегмент, как описано далее ниже.

#### b. Другие органы.

Предусмотренные в настоящем документе способы можно использовать для большого разнообразия органов в зависимости от различных факторов, в том числе целевой нуклеиновой кислоты или кодируемого полипептида, доступности органа и его сосудистой системы, расстройства или заболевания, подлежащего лечению, природы кодируемого полипептида и других факторов. В дополнение к печени органом-мишенью или его частью для осуществления сосудистой изоляции и компартиментализации могут быть ЦНС (головной или спинной мозг), периферическая нервная система (например, нервы), поджелудочная железа, желчный пузырь, эндокринные железы (гипофиз, надпочечники, щитовидная железа, т.п.), сердечно-сосудистые органы (например, сердце и кровеносные сосуды), кожа, урогенитальные органы (почки, матка, шейка матки, простата, мочеиспускательный канал), органы дыхательной системы (например, легкие или дыхательные пути), кости, мышцы и кишечник. Этот список не является исчерпывающим, так специалист в данной области техники может определить дополнительные органы-мишени и их доли.

Кожа представляет собой орган-мишень для практического применения компартиментализованного способа по настоящему документу. Например, кератиноциты кожи являются подходящими клетками-мишенями для генотерапии, и их лечение может подходить для заболеваний или состояний, вызванных генетическими дефектами, системных заболеваний за счет продукции белков, которые могут высвобождаться в кровообращение, и ран или шрамов (например, Meng et al. (1998) J. Clin. Invest., 101:1462; Liu et al. (2001) Yonsei Medical Journal, 42:634-645). Также было показано, что кожа толерантна к коротким периодам ишемии, которая может возникать при применении способов компартиментализации в настоящем документе (см., например, Willms-Kretschmer and Majno (1969) The American Journal of Pathology, 54:327). Например, в способах в настоящем документе компартиментализация поддерживается на протяжении периода времени, достаточного для трансдукции клеток или проникновения доставляемого агента

в клетки (например, кератиноциты). Например, период времени компартиментализации может быть меньше 2 ч и обычно составляет по меньшей мере 10, 15, 20, 30 или 60 мин.

Компартиментализацию кожи можно осуществить любым методом, описанным в настоящем документе, с помощью которого можно отрезать кожу от периферического кровообращения. В конкретных примерах можно использовать зажимы. В таких примерах складки кожи могут быть изолированы или мобилизованы и помещены в зажим. Давление зажима можно регулировать, как описано в настоящем документе, таким образом, что достигается изоляция от общей системы кровообращения (см., например, Willms-Kretschmer and Majno (1969) *The American Journal of Pathology*, 54:327).

Легкое представляет собой орган-мишень для практического применения компартиментализованного способа по настоящему документу. Генотерапию легкого можно применять для острых и хронических заболеваний, в том числе, например, для рака, астмы, муковисцидоза, дефицита альфа-1-антитрипсина и синдрома дыхательной недостаточности. В способах в настоящем документе, как правило, осуществляют компартиментализацию сегмента или области легкого, при сохранении вентиляции через легкие. Например, может быть компартиментализован бронхиальный сегмент легкого. Компартиментализацию можно осуществить путем окклюзии бронхиальных артерий, используя сосудистые зажимы, и/или путем непосредственного зажатия паренхимы бронхов. Генотерапию почек можно использовать для лечения заболеваний почек, в том числе наследственных заболеваний почек (например, синдром Альпорта). Компартиментализацию почек можно осуществить, например, путем окклюзии почечных ножек, например, с помощью зажатия почечной ножки; путем региональной паренхимной компрессии с помощью зажатия паренхимы почки с использованием сосудистого зажима, такого как длинный изогнутый сосудистый зажим; или с помощью стяжек кабелей, жгутов или бандажей для почек. Для паренхимного зажатия можно использовать лапароскопические зажимы на паренхиму, включая, но не ограничиваясь ими, зажим Сатинского или Дебейки (см., например, Toren et al. (2010) *Can. Urol. Assoc.*, 4:E133-E136; Ko et al. (2010) *Korean J. Urol.*, 51:8-14 и Joung et al. (2007) *Korean J. Urol.*, 28:265-269).

## 2. Доставка молекулы нуклеиновой кислоты путем введения доставляемого агента.

В способах по настоящему документу нуклеиновую кислоту доставляют в клетки органа или ткани, или их части путем введения доставляемого агента непосредственно в клетки ткани. Доставляемый агент можно вводить до, одновременно, с промежутком или после начала компартиментализации органа или его части. Как правило, в способах в настоящем документе доставляемый агент вводят сразу после начала компартиментализации органа или его части, например в течение 10 мин или не более чем через 10 мин и обычно не более чем через 5 мин после начала компартиментализации органа или его части. Например, доставляемый агент доставляют субъекту не более чем через 30 с, 1, 2, 3, 4 или 5, 6, 7, 8, 9 или 10 мин после начала компартиментализации.

### а. Способы доставки и способы введения.

Доставка молекулы нуклеиновой кислоты путем введения доставляемого агента осуществляется любым способом введения, с помощью которого можно доставить доставляемый агент в клетки компартиментализованного органа или его части у субъекта и, в частности, в целевые клетки ткани-мишени для экспрессии в них генов. Например, доставка осуществляется непосредственно в паренхимные клетки. В случае печени целевыми паренхимными клетками являются гепатоциты, тогда как непаренхимные клетки включают клетки эндотелия сосудов, купферовские клетки и поддерживающие стромальные клетки.

В некоторых примерах доставка доставляемого агента пациенту может быть прямой, в этом случае клетки субъекта непосредственно подвергают воздействию доставляемого агента (например, доставка *in vivo*). Например, доставляемый агент можно доставлять путем непосредственной инъекции в паренхиму или интерстициальное пространство тканей. В других примерах доставка доставляемого агента может быть непрямой, в этом случае клетки сначала трансформируют доставляемым агентом *in vitro*, далее трансплантируют пациенту (например, доставка *ex vivo*). Например, для *ex vivo* способов генотерапии паренхимные клетки можно выделить из тела и подвергнуть воздействию доставляемого агента *ex vivo* с последующей реимплантацией клеток в компартиментализованную ткань или орган, или его часть.

В конкретных примерах доставляемый агент доставляют путем непосредственной инъекции в ткань или орган. Например, доставляемый агент доставляют путем инъекции в паренхиму ткани или органа, например, путем введения в паренхиму компартиментализованных тканей или органов, или их частей, таких как мышцы (внутримышечно), печень, головной мозг, почки и другие ткани или органы, как описано в настоящем документе или известно в данной области техники. Интерстициальная доставка в паренхиму имеет преимущества перед способами системной доставки. Системная доставка нуклеиновых кислот, например, путем внутривенного введения, введения в портальную вену и внутриартериального введения доставляемых агентов увеличивает экспозицию доставляемого агента в системное кровообращение. Это может приводить к неселективной доставке в ткани, уменьшению или снижению эффективности поглощения клетками, что приводит к уменьшению экспрессии гена, необходимости в больших количествах или дозах доставляемого агента для осуществления поглощения клетками ткани, воздействию на иммунные клетки и активации нежелательного иммунного ответа, а также к другим проблемам, связанным со способами системной доставки. В настоящем документе было обнаружено, что непосредственная инъекция в интерстициальное пространство, совмещенная с компартиментализацией клеток тка-

ни (например, путем сосудистой изоляции), увеличивает частоту и эффективность поглощения доставляемого агента клетками ткани, при этом минимизируя экспозицию в системное кровообращение.

Например, в дополнение к увеличению частоты и эффективности поглощения доставляемого агента клетками ткани, с помощью доставки в паренхиму можно избежать воздействия доставляемого агента на иммунные клетки. Например, для доставки молекулы нуклеиновой кислоты в печень или ее часть с помощью интерстициальной доставки путем непосредственной инъекции в паренхиму доставляемого агента, например, путем внутривенной инъекции, можно избежать поглощения купферовскими клетками (см., например, Cretaz et al. (2006) *Hepatology*, 44:623-632). Купферовские клетки, являющиеся фагоцитирующими макрофагами печени, присутствуют в синусоидах печени и, таким образом, подвергаются воздействию доставляемого агента, который вводится внутривенно. В отличие от этого, гепатоциты, клетки ткани печени, отделены от синусоидов пространством Диссе. Поэтому с помощью направленной доставки доставляемого агента непосредственно в гепатоциты, которые располагаются в интерстициальном пространстве, можно избежать нежелательного провоспалительного ответа, который может быть инициирован активацией купферовских клеток, и можно увеличить поглощение резидентными клетками ткани. Аналогично, также предполагается доставка доставляемого агента непосредственно в интерстициальные клетки других органов. Таким образом, в способах в настоящем документе доставляемый агент или его композиции доставляют непосредственно в тканевую паренхиму.

Как правило, доставляемый агент, который доставляют, предусмотрен в виде композиции. Примерами таких доставляемых агентов и композиций являются доставляемые агенты и композиции, которые описаны в разделах D и E соответственно. Доставляемый агент может быть доставлен в фармацевтически приемлемой жидкости или в водном носителе. Доставляемый агент можно вводить непосредственно в ткань или орган, или его часть путем инъекции, используя иглу или другое аналогичное устройство. Объем доставляемого агента в носителе, который должен быть доставлен, составляет или составляет примерно от 0,5 до 100 мл, например от 0,5 до 50 мл, от 1 до 20 мл, от 5 до 50 мл или от 5 до 20 мл.

#### b. Способы облегчения доставки.

Обычно в способах в настоящем документе используются способы инъекционирования, которые позволяют избежать инъекции в артерии, вены и другую ассоциированную сосудистую систему, и также в сосуды системы протоков и лимфатической системы. Доставке доставляемых агентов путем инъекционирования в паренхиму можно способствовать, используя методы визуализации, которые позволяют дифференцировать паренхимную ткань и клетки от окружающих сосудистых и ассоциированных структур. Визуализацию можно осуществить непосредственно перед инъекцией, одновременно с инъекцией и/или после инъекции. Такие методы визуализации включают, но не ограничиваются ими, получение изображений методом ядерного магнитного резонанса (MRI), ультразвуковые методы и методы сонографии, в том числе доплеровскую сонографию. Например, можно использовать B-flow, 3-D визуализацию или цветовую доплерографию. Если необходимо, для облегчения визуализации могут быть инъекционированы контрастные агенты. Например, такие способы также можно использовать для минимизации возможности введения агента в просвет сосудистой системы или системы протоков.

В предусмотренных в настоящем документе способах, если необходимо, эффективность поглощения доставляемого агента клетками ткани можно увеличить, используя различные методы, известные специалисту в данной области техники. Понятно, что методики, которые увеличивают поглощение доставляемого агента, могут снизить время компарментализации (обсуждалось выше), потому что будет требоваться меньше времени, чтобы достаточное количество доставляемого агента было захвачено клетками. Выбор конкретной методики может осуществить опытным путем специалист в данной области техники, и он зависит от конкретного доставляемого агента, который доставляется, пути введения (например, конкретная ткань или орган) и дозы или количества вводимого агента. В одном из примеров, доставляемый агент может быть составлен в виде композиции вместе с липидами, полимерными реагентами для трансфекции или другими агентами. В других примерах для увеличения доставки можно использовать физические способы. Примеры физических способов для увеличения доставки доставляемого агента включают, но не ограничиваются ими, способ "генной пушки", электропорацию, сонопорацию, давление или ультразвук. Альтернативно для увеличения доставки гена *in vivo* с минимальным повреждением ткани можно вводить фармацевтические композиции, используя фемтосекундный инфракрасный лазер (LBGT technology). В одном из примеров поглощение доставляемых агентов и, в частности, доставляемых агентов, которые представляют собой вирусы или вирусоподобные частицы, такие как аденовирус, может быть увеличено за счет присутствия различных агентов. Например, доставляемый агент можно вводить с агентом или соединением, который представляет собой транскрипционный энхансер вирус-специфического рецептора поверхности клеток. Такие агенты или соединения включают, например, ингибиторы гистондеацетилазы (HDAC). Ингибиторы HDAC включают соединения из класса гидроксамовых кислот, циклических тетрапептидов, бензамидов, электрофильных кетонов или алифатических кислот. Например, ингибиторы HDAC включают, но не ограничиваются ими, трихостатин А, воринонстат (SAHA), белинонстат (PXD101), LAQ824, панобинонстат (LBH589), энтинонстат (MS-275), С199, моцетиностат (MGCD0103), ромидепсин (истодакс), вальпроевую кислоту, PCI-24781, SB939, ресминонстат, гивинонстат, CUDC-101, AR-42, CHR-2845, CHR-3996, 4SC-202, CG200745, кеветрин или трихостатин А

(TSA). Примером ингибитора HDAC является вальпроевая кислота, которая представляет собой транскрипционный энхансер аденовирусного рецептора CAR и терапевтического трансгена. Исследования показали, что поглощение аденовирусов увеличивается в присутствии вальпроевой кислоты (Segura-Rancheco et al. (2007) *Genet. Vaccines Ther.*, 5:10). В таких примерах вирусный вектор составлен в виде одной композиции с агентом или отдельных композиций. В примерах, в которых вирусный вектор составлен в виде отдельной композиции, агент или соединение, которые представляют собой транскрипционный энхансер, доставляют перед доставкой доставляемого агента. Агент, представляющий собой транскрипционный энхансер, можно вводить в дозе между или примерно между 1 и 100 мг/кг, например между или примерно между 20 и 60 мг/кг, например 40 мг/кг. Дозы могут быть разделены и вводиться отдельно для достижения полной дозы. Например, цикл введения может составлять 1, 2, 3, 4 или 5 раз в день. Частота введения может составлять один раз в день на протяжении по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7 дней или 2 недели. Агент можно вводить любым способом введения, например подкожно, внутривенно, перорально или местно. В конкретных примерах агент вводят непосредственно в паренхиме.

В некоторых примерах доставляемый агент составлен в виде композиции вместе с носителем для доставки, который связывается или образует комплекс с доставляемым агентом и опосредует проникновение в клетки. Примеры агентов включают, но не ограничиваются ими, катионные липосомы и липиды, липопротеины, синтетические полимеры или полипептиды, минеральные соединения или витамины. Примеры полимеров включают поликатионы или полианионы. Например, доставляемый агент может быть составлен в виде композиции вместе с полиамином, преципитатом фосфата кальция, гистоновым белком, протамином, полиэтиленамином, полилизинном, полиаргинином, полиорнитином, DEAE декстраном, полибренном, комплексом полиамфолитов, спермином, спермидином, путресцином, сывороточным альбумином человека, ДНК-связывающими белками, негистоновыми хромосомными белками, белками оболочки из ДНК вирусов и полимерами N-замещенных глицинов.

Например, доставляемый агент может быть инкапсулирован в липиды или упакован в липосомы перед доставкой субъекту или в клетки, полученные из субъекта. Инкапсуляцию в липиды обычно осуществляют, используя липосомы, которые могут стабильно связывать или включать и сохранять нуклеиновую кислоту. Отношение доставляемого агента конденсированной нуклеиновой кислоты к препарату липидов может варьировать, но обычно будет составлять примерно 1:1 (мг ДНК:микромоль липидов), или может быть использовано большее количество липидов. Липосомные препараты включают катионные (положительно заряженные), анионные (отрицательно заряженные) и нейтральные препараты. Такие препараты хорошо известны специалисту в данной области техники и легкодоступны. Например, примеры катионных липидов включают, но не ограничиваются ими, N[1-2,3-диолеилокси]пропил]-N,N,N-триэтиламоний (DOTMA; доступный под торговым названием Lipofectin®); DDAB/DOPE и DOTAP/DOPE. Анионные и нейтральные липосомы также являются легкодоступными и могут быть получены из фосфатидилхолина, холестерина, фосфатидилэтаноламина, диолеилфосфатидил холина (DOPC), диолеилфосфатидил глицерина (DOPG), диолеилфосфатидил этаноламина (DOPE), например, как коммерчески доступный препарат Avanti Polar Lipids. Липосомы включают многослойные везикулы (MLV), маленькие однослойные везикулы (SUV) или большие однослойные везикулы (LUC).

В некоторых примерах доставляемый агент может представлять собой наночастицу, которая содержит функциональную группу или агент направленного действия для дальнейшего способствования и усиления клеточной доставки агента, например молекулу направленного действия, которая связывается с рецепторами, экспрессируемыми на клетках-мишенях. Функциональные группы или агенты направленного действия включают, например, фрагмент направленной доставки в клетку, который усиливает ассоциацию агента или комплекса с клеткой. Фрагмент направленной доставки в клетку может представлять собой, например, белок, пептид, липид, стероид, сахар, углевод, (не экспрессирующую) полинуклеиновую кислоту или синтетическое соединение, но не ограничивается ими. Например, сигналы направленной доставки в клетку могут включать лиганды, которые усиливают связывание с рецепторами клеток. Такие лиганды включают, но не ограничиваются ими, инсулин, фактор роста (например, EGF или FGF), трансферрин, пептиды, которые включают последовательность RGD. Другие фрагменты направленной доставки включают, но не ограничиваются ими, химические группы, которые реагируют с тиольными, сульфгидрильными или дисульфидными группами на клетках, фолат и другие витамины.

В примерах в настоящем документе инъекцию можно облегчить с помощью электропорации. Электропорация представляет собой метод, в котором используется импульсное электрическое поле для создания временных пор в клеточной мембране без необратимого повреждения клетки, что, таким образом, делает возможным введение экзогенных молекул. При подборе электрического импульса, генерируемого электрофоретической системой, доставляемые агенты могут попасть в клетку через каналы или поры, создаваемые в процессе осуществления метода. Способы, использующие электропорацию для доставки доставляемых агентов *in vivo*, в том числе в мышцы, печень, кожу и другие ткани или органы, известны в данной области техники (см., например, патент США № 5704908; опубликованную заявку США № US2002/0102729; Titomirov, A.V., et al. (1991) *Biochim Biophys Acta* 1088: 131-134; Muramatsu, T., et al. (1997) *Biochem Biophys Res Commun* 233: 45-49; Suzuki, T., et al. (1998) *FEBS Lett* 425: 436-440; Aihara, H. and Miyazaki, J. (1998) *Nat Biotechnol* 16: 867-870; Mir, L.M., et al. (1998) *C R Acad Sci III* 321: 893-899;

Rizzuto, G., et al. (1999) Proc Natl Acad Sci USA 96: 6417-6422; Goto, T., et al (2000) Proc Natl Acad Sci USA 97:354-359; Somiari, S., et al. (2000) Mol Ther 2:178-187).

В примерах, где доставка осуществляется в клетки *ex vivo*, обычно в клетки, выделенные из субъекта, можно использовать любой способ доставки нуклеиновой кислоты в клетки, известный специалисту в данной области техники, в том числе любой из описанных способов, применимых для доставки *in vivo*. Например, доставку нуклеиновых кислот можно осуществить, используя трансфекцию, опосредованную декстраном, преципитацией фосфатом кальция, трансфекцию, опосредованную полибренном, слияние протопластов, электропорацию, инкапсуляцию в липосомы или прямую микроинъекцию ДНК. Также для доставки вирусной ДНК клетки могут быть трансдуцированы вирусной частицей. Трансформированные клетки далее используются в качестве доставляемого агента для применения в способах в настоящем документе. Способы для доставки *ex vivo* и реимплантации субъекту трансформированных клеток, используемых в качестве доставляемого агента, известны и описаны в данной области техники (см., например, международную опубликованную заявку № WO93/14778).

с. Дозы и схемы для доставки.

Количество или дозу вводимого доставляемого агента можно определить опытным путем, основываясь на конкретном применении. В соответствии со способом по настоящему документу кинетика зависимости ответа от дозы является линейной, так что существует прямая корреляция между количеством вводимого доставляемого агента, например вируса, такого как аденовирус или аденоассоциированный вирус или другой вирус, и продуцируемым трансгенным продуктом. Например, было обнаружено, что для получения терапевтического количества белка достаточно 40 геномов трансдуцированного вируса (см., например, Nathwani et al. (2002) Blood, 100:1662). Таким образом, в способах по настоящему документу способ дает возможность вводить более низкие количества вируса для получения достаточного числа копий генома в результате вирусной трансдукции клеток, например, гепатоцитов печени, для получения терапевтического количества кодируемого белка. Например, количество достаточно для трансдукции клеток 40 геномами вируса на клетку или более. Способы в настоящем документе могут далее увеличить число копий генома на клетку, и, тем самым, дополнительно увеличить устойчивую экспрессию продукта при более низкой дозе по сравнению с существующими способами. Таким образом, используя способы по настоящему документу, можно точно коррелировать количество инъецируемых частиц, количество внутриклеточных геномов и количество экспрессируемого белка.

Это предоставляет преимущества по сравнению с существующими в данной области техники способами генотерапии. Например, в существующих способах для доставки аденовируса, например в существующих способах для доставки в печень, зависимость ответа от дозы для трансдукции печени является нелинейной, при этом низкие дозы приводят к необнаруживаемой экспрессии белка, тогда как в случае высоких доз достигается экспрессия трансгена (Rosewell et al. (2011) J. Genet. Syndr. Gene Ther., S5:1-16). Высокие дозы, тем не менее, также инициируют иммунную активацию и вызывают токсичность. Таким образом, используя существующие способы доставки аденовирусных генов, нужно сбалансировать уровни доз, требуемые для достижения достаточной экспрессии трансгена, при этом достигая такой дозы, которая не приводит к токсическому летальному действию. Обычно в существующих способах эти количества вводимого аденовируса для достижения достаточной продукции белка являются относительно высокими и составляют примерно или примерно более чем  $1,5 \times 10^{12}$  вирусных частиц на килограмм (vp/kg), и обычно составляют по меньшей мере  $1 \times 10^{11}$  вирусных частиц (vp) на килограмм (кг) (vp/kg), например по меньшей мере  $5 \times 10^{11}$  vp/kg или больше. Например, для достижения устойчивой экспрессии для восстановления 8% активности фактора IX у макака было необходимо введение AAV, кодирующего фактор IX, в дозе  $4 \times 10^{12}$  vp/kg внутривенно (Nathwani et al. (2002) Blood, 100:1662). В клинических исследованиях на человеке было показано, что для корректировки 10% активности фактора IX только на несколько дней требуются дозы  $4 \times 10^{11}$  vp/kg, и экспрессия продолжается на протяжении только 2-6 недель (Mingozzi et al. (2011) Nature Reviews Genetics, 12:341). Также эти количества, которые, как правило, вводят внутривенными способами доставки, все же имеют некоторые недостатки, связанные с небольшой токсичностью, иммунной активацией и/или повреждением ткани.

В частности, в компартиментализованных способах в настоящем документе доза или количество вводимого доставляемого агента представляет собой такую дозу или количество, что белковый продукт продуцируется на уровне, при котором можно получить терапевтический или профилактический эффект. Как правило, в способах в настоящем документе уровень поддерживается на протяжении по меньшей мере 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 16, 18, 20, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96 месяцев, 10, 15 лет или дольше. Поскольку существует линейная взаимосвязь между вводимым доставляемым агентом и количеством продуцируемого продукта, такие дозы может определить специалист в данной области техники. Параметры, учитываемые для определения дозы, могут включать конкретную генетическую терапию и терапевтический продукт, период полувыведения белкового продукта, промотор, используемый для экспрессии продукта трансгена, конкретный доставляемый агент и другие аналогичные факторы.

Когда доставляемый агент представляет собой невирусную нуклеиновую кислоту, эффективная доза (количество) ДНК или РНК находится в диапазоне от или примерно от 0,005 до или примерно до 50

мг/кг массы тела. Обычно доза составляет от или примерно от 0,005 мг/кг до или примерно до 20 мг/кг или больше, обычно от или примерно от 0,05 до примерно или до 5 мг/кг. Например, для невирусной нуклеиновой кислоты (например, плазида, оголенная ДНК, миРНК, кшРНК или антисмысловая нуклеиновая кислота) доставляют от 0,01 до 2000 мг, например от 0,05 до 1500 мг, от 1 до 1000 мг, от 10 до 1500 мг или от 100 до 1000 мг.

Когда доставляемый агент представляет собой вирус, такой как аденовирус или аденоассоциированный вирус, или другой вирус, дозы, как правило, предусмотрены в виде числа вирусных частиц (vp) или бляшкообразующих единиц (БОЕ), и дозы обычно составляют меньше  $1 \times 10^{12}$  частиц в общем или  $1 \times 10$  БОЕ, и обычно находятся в диапазоне или примерно в диапазоне от 10 до  $1 \times 10^{12}$  частиц, от 10 до  $1 \times 10^6$  частиц, от  $1 \times 10^3$  до  $1 \times 10^{12}$  частиц, например от  $1 \times 10$  до  $1 \times 10^{10}$  частиц или от  $1 \times 10^7$  до  $1 \times 10^9$  частиц, или в диапазоне или примерно в диапазоне от 10 до  $1 \times 10^{12}$  БОЕ, от 10 до  $1 \times 10^6$  БОЕ, от  $1 \times 10^3$  до  $1 \times 10^{12}$  БОЕ, например от  $1 \times 10^6$  до  $1 \times 10^{10}$  БОЕ или от  $1 \times 10^7$  до  $1 \times 10^9$  БОЕ. Могут требоваться более низкие или высокие дозы, чем указанные выше. Конкретные доза и схема лечения для любого конкретного субъекта или пациента могут зависеть от различных факторов, в том числе конкретной генетической терапии и ее терапевтического продукта, активности конкретного соединения или агента, возраста, массы тела, общего состояния здоровья, пола, диеты, времени введения, скорости экскреции, комбинации лекарств, тяжести и течения заболевания, состояния или симптомов, предрасположенности субъекта или пациента к заболеванию, состояниям или симптомам, способа введения и решения лечащего врача. Определение точной дозы находится в пределах компетентности лечащего врача, специалиста в данной области техники.

Обычно, используя компартиментализованные способы по настоящему документу, можно вводить значительно меньшее количество доставляемого агента по сравнению с существующими способами для достижения оптимальной доставки молекулы нуклеиновой кислоты, такой как молекула терапевтической нуклеиновой кислоты. Кроме того, количество вводимого доставляемого агента можно контролировать благодаря линейной взаимосвязи между дозой доставляемого агента и количеством продуцируемого терапевтического продукта. В результате можно вводить до 100 раз меньше или еще меньше доставляемого агента, используя способы по настоящему документу, чем в случае внутривенного введения того же самого доставляемого агента. Например, количество вводимого доставляемого агента в способах в настоящем документе может быть в 10, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 5000, 10000 раз меньше или еще меньше по сравнению с количеством того же самого доставляемого агента, который вводят внутривенно в целевой орган или ткань. Определение конкретного количества доставляемого агента, вводимого в способах в настоящем документе, основываясь на конкретном доставляемом агенте, молекуле нуклеиновой кислоты и заболевании или состоянии, которое подвергается лечению, находится в пределах компетентности специалиста в данной области техники.

Специалисту в данной области техники известны применения разнообразных векторов и агентов для генотерапии для лечения различных заболеваний или расстройств. Основываясь на дозах и количествах агентов, доставляемых путем внутривенного введения (или другими способами введения) в существующих в данной области техники протоколах, специалист в данной области техники может изменять дозу того же самого вектора или агента, снижая ее, для применения для введения в паренхиму компартиментализованной ткани или органа, или его части с использованием способов по настоящему документу. Например, для генотерапии печени аденовирусом, таким как рекомбинантный аденовирус, содержащий гетерологичную молекулу нуклеиновой кислоты в своем геноме, людям вводили дозу аденовируса, составляющую или составляющую примерно от  $2 \times 10^9$  до  $6 \times 10^{11}$  vp/кг, что соответствует примерно от  $1,5 \times 10^{11}$  vp до  $4,5 \times 10^{13}$  vp для человека средней массы 75 кг, и обычно это имело небольшой успех из-за токсичности и/или летального действия или из-за неэффективной трансдукции гепатоцитов (Brunetti-Pierri et al. (2009) *Molecular Therapy*, 17:327-333). В способах в настоящем документе, например, аденовирус, такой как рекомбинантный аденовирус, содержащий гетерологичную молекулу нуклеиновой кислоты в своем геноме, вводят в печень или другую ткань или орган, или его часть в количестве менее чем  $1 \times 10^{12}$  vp или менее чем  $1 \times 10^{12}$  БОЕ и, как правило, менее чем  $1 \times 10^{10}$  vp или менее чем  $1 \times 10^{10}$  БОЕ. Например, используя компартиментализованные способы по настоящему документу, в способах генотерапии печени можно вводить менее чем  $1 \times 10^{12}$  vp,  $1 \times 10^{11}$  vp,  $1 \times 10^{10}$  vp,  $1 \times 10^9$  vp,  $1 \times 10^8$  vp,  $1 \times 10^7$  vp,  $1 \times 10^6$  vp,  $1 \times 10^5$  vp,  $1 \times 10^4$  vp,  $1 \times 10^3$  vp или меньше аденовируса. В другом примере, используя компартиментализованные способы по настоящему документу, в способах генотерапии печени можно вводить менее чем  $1 \times 10^{12}$  БОЕ,  $1 \times 10^{11}$  БОЕ,  $1 \times 10^{10}$  БОЕ,  $1 \times 10^9$  БОЕ,  $1 \times 10^8$  БОЕ,  $1 \times 10^7$  БОЕ,  $1 \times 10^6$  БОЕ,  $1 \times 10^5$  БОЕ,  $1 \times 10^4$  БОЕ,  $1 \times 10^3$  БОЕ или меньше аденовируса. В таких примерах количество может быть предусмотрено для введения такому субъекту, как человек.

Способы титрования вирусов с целью приготовления их композиций и/или определения дозы хорошо известны специалисту в данной области техники. Например, титры можно определить с помощью анализа OD<sub>260</sub>, в котором измеряется концентрация вирусной ДНК и белка. Для проведения такого анализа требуется очищенный вирусный материал, поскольку сыворотка и другие факторы, содержащиеся в среде для выращивания вирусов, могут влиять на показания оптической плотности. Например, вирус

можно очистить с помощью зонального центрифугирования, используя градиент плотности CsCl, или другими способами, известными специалисту в данной области техники. Как правило, делают разведения вирусов. Значение оптических единиц частиц (ору) или вирусных частиц (вр) на 1 мл можно определить по поглощению. Например, для аденовируса вр/мл определяют, умножая  $1,1 \times 10^{12}$  на поглощение OD<sub>260</sub> и кратность разведения вируса. В анализе OD<sub>260</sub> не различаются живые и мертвые вирусы. В другом примере титр можно определить с помощью анализа бляшкообразования, используя стандартные методики, известные специалисту в данной области техники. Как правило, клетки, которые могут быть выращены в виде монослоя, например клетки 293, высевают с умеренно высокой плотностью (например, составляющей или составляющей примерно или больше 70%) с последующим инфицированием их вирусным материалом с различной кратностью разведений. По прошествии времени, достаточного для инфекции и трансдукции клеток, к клеткам добавляют раствор агарозы. Бляшки, которые образуются в результате лизиса клеток, видны на протяжении нескольких дней и на протяжении до 10 дней могут быть посчитаны (как правило, с использованием красителя, который позволяет отличить области бляшек). Титр рассчитывают как бляшкообразующие единицы (БОЕ) на 1 мл, разделяя число бляшек на фактор разведения. В дополнительном примере можно использовать анализ конечных разведений. Этот анализ аналогичен анализу бляшкообразования, за исключением большего числа используемых разведений (обычно от  $10^{-3}$  до  $10^{-10}$ ). Также вместо добавления верхнего слоя агарозы для идентификации бляшек планшеты с инфицированными клетками визуализируют вручную под микроскопом для идентификации лунок с цитопатическим эффектом (CPE). Лунки планшета можно оценить, чтобы определить конечное разведение, основываясь на методе Спирмена-Кербера.

Схема дозирования для лечения может представлять собой режим с однократной инъекцией или режим с многократными инъекциями. Частота дозирования может зависеть от вводимого агента, прогрессирования заболевания или состояний у субъекта и других соображений, известных специалисту в данной области техники. Например, доставляемые агенты или композиции могут доставляться 1 раз или могут доставляться путем многократных введений, например по меньшей мере или примерно или 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 введениями. Лечение может представлять собой лечение с использованием единственного сайта для введения (целевого сайта) или с использованием множества целевых сайтов. Например, доставку доставляемого агента можно осуществить в виде однократной инъекции в целевой сайт или можно осуществить в виде повторяющихся инъекций в целевой сайт. В качестве примера в лечении заболевания легких, такого как муковисцидоз, может быть необходимым делать многократные инъекции по меньшей мере в 25, 50, 75, 80, 85, 90 или 95% легких для достижения достаточной продукции трансгена и/или функционального улучшения у субъекта. Таким образом, можно использовать множество сайтов для инъекции. Повторные инъекции можно осуществлять последовательно, например непосредственно после первой инъекции, или можно отложить на минуты, часы, дни или годы. В некоторых примерах доставляемый агент вводят больше чем в одно место в органе или его части, особенно, если требуются высокие уровни трансдукции. Например, в некоторых вариантах воплощения в дополнение к первому сайту введения композицию, содержащую доставляемый агент, вводят в другой сайт или место. Другой сайт или место могут находиться в месте, прилегающем или расположенном около первого сайта введения в той же области или части ткани-мишени, или могут находиться в месте, удаленном от первого места, но в том же самом органе-мишени (например, разные доли или области печени или легких).

### 3. Прекращение/снятие компарментализации.

После доставки доставляемого агента компарментализация ткани или органа, или его части поддерживается на протяжении периода времени, достаточного для того, чтобы обеспечить поглощение доставляемого агента и/или минимизировать попадание доставляемого агента в системное кровообращение. Например, компарментализация продолжается достаточное время, чтобы обеспечить проникновение доставляемого агента в клетку и при этом избежать попадания в системное кровообращение. Эффект этой компарментализации заключается в том, что токсичность и иммунная активация минимизированы. Обычно компарментализация ткани или органа, или его части поддерживается с целью ограничения, минимизации или устранения токсичности и иммунной активации (например, как оценивается по локальной или системной экспрессии цитокинов, воспалительным инфильтратам, таким как инфильтраты нейтрофилов и лимфоцитов, и/или тканевым ферментам). Определение опытным путем точного периода времени для поддержания компарментализации, основываясь на факторах, которые включают конкретный вводимый доставляемый агент, целевые ткань или орган или его часть, субъекта, подвергаемого лечению, или конкретное применение, находится в пределах компетентности специалиста в данной области техники. Способы и методы оценки экспрессии генов и параметров, связанных с иммунной активацией и токсичностью, известны специалисту в данной области техники, и примеры таких способов и методов описаны в разделе F.

В примерах в настоящем документе компарментализация ткани или органа, или его части поддерживается на протяжении достаточного периода времени, так что меньше 10% и обычно меньше 5, 4, 3, 2, 1% или меньше доставляемого агента попадает в системное кровообращение. Способы оценки системных уровней доставляемого агента или продукта трансгена предусмотрены в разделе F. Также в примере 2 приведены примеры анализов для обнаружения доставляемого агента в общей системе кровообраще-

ния, например в периферической крови.

В примерах в настоящем документе компарментализацию ткани или органа, или его части поддерживают такое время, чтобы обеспечить клеточное поглощение более или примерно более или 80, 85, 90 или 95% выбранного доставляемого агента клетками ткани, органа или его части. Например, компарментализацию ткани или органа, или его части поддерживают такое время, чтобы по меньшей мере 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или больше доставляемого агента присутствовало внутри резидентных клеток ткани или органа. Например, для доставки в печень компарментализацию печени или ее части поддерживают такое время, чтобы по меньшей мере 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или больше доставляемого агента было захвачено внутрь клеток гепатоцитами. Способы оценки присутствия и локализации внутри клеток доставляемых агентов описаны в разделе F.

Используя способ, предусмотренный в настоящем документе, можно достичь продолжительной экспрессии в ткани или органе, или его части на протяжении более 60, более 90 дней, более 6, более 7, более 8, более 9, более 10, более 11, более 12, более 18 или более 24 месяцев. Как правило, компарментализацию ткани или органа, или его части поддерживают на протяжении периода времени, достаточного, чтобы достичь экспрессии продуктов генов на протяжении по меньшей мере 1 года.

Оптимальная продолжительность компарментализации может зависеть от разнообразных факторов, которые включают конкретный орган или ткань, или ее часть, доставляемый агент и конкретный способ, используемый для доставки. Например, различные резидентные клетки ткани или органа обладают разной способностью к эндоцитозу и кинетикой внутриклеточного поглощения доставляемого агента. На функцию эндоцитоза может влиять конкретный доставляемый агент, или она может зависеть от конкретного доставляемого агента. Например, для доставляемого агента, который представляет собой вирусный вектор, такой как аденовирус, кинетика аденовирусной инфекции начинается со связывания и взаимодействия с его рецепторами, которыми для подгрупп аденовирусов A, C-F является рецептор вируса Коксаки B Ad (CAR). Связывание с первичным рецептором опосредует эндоцитоз ассоциированного вируса. В течение 1 мин после трансдукции обычно примерно 2% вируса оказывается внутри клеток. Распакованный аденовирус попадает в цитозоль при высвобождении эндосомального содержимого в цитоплазму. В течение до 30 мин после трансдукции примерно 80% вируса оказывается внутри клеток. При дальнейшей распаковке капсид транспортируется через цитоплазму, где он, в конечном итоге, доставляет вирусную ДНК в клеточное ядро. В течение до 60 мин после трансдукции все трансгены доставляются в ядро.

В настоящем документе доставляемый агент, доставляемый в ткань или клетку, представляет собой такой агент, который может быть захвачен резидентными клетками. Если необходимо, доставляемый агент может быть модифицирован для увеличения или содействия проникновению в конкретную клетку. Например, в данной области техники известны модификации фибрин-белка капсомера аденовируса, чтобы сделать возможным прикрепление вирусного вектора к клеткам-мишеням для эффективного проникновения вируса (см., например, Campos et al. (2007) *Curr. Gene Ther.*, 7:189-204; Russell WC, (2009) *J Gen. Virol.*, 90:1-20). Также понятно, что период времени внутриклеточного поглощения можно снизить, используя агенты, которые способствуют поглощению. Такие агенты включают электропорацию, генную пушку, сонопорацию, липоплексы, полиплексы, детергенты или композиции с агентами или соединениями, которые увеличивают транскрипцию рецептора, участвующего в поглощении, и другие способы, известные специалисту в данной области техники, такие как способы, описанные выше в настоящем документе. Кинетику проникновения доставляемого агента в клетку, например в резидентную клетку ткани или органа *in vivo*, можно определить способами, известными в данной области техники (см., например, раздел F).

Кроме того, оптимальная продолжительность сосудистой компарментализации может зависеть от толерантности органа или ткани, или их частей и их резидентных клеток к условиям ишемии, что является предметом рассмотрения в способах в настоящем документе. Некоторые органы или ткани обладают меньшей толерантностью к условиям ишемии по сравнению с другими. Например, при сосудистой изоляции гепатоциты обычно дольше сохраняют жизнеспособность, чем нейроны или кардиомиоциты. Печень обычно толерантна к нарушению кровотока до 60 мин или больше (Abdalla et al. (2004) *Surg. Clin. N. Am.*, 84:563-585). Для почек сосудистую изоляцию можно осуществить на протяжении заранее установленного времени, чтобы практически все нуклеиновые кислоты были захвачены клетками ткани. Почки, как правило, толерантны к периодам ишемии до 2 ч, но обычно не больше 1 ч или не больше 30 мин (Hoffman et al. (1974) *AMA Arch. Surg.*, 109:550-551; Thompson et al. (2006) *J. Urology*, 177:471-476). Мышцы толерантны к ишемии на протяжении периода времени до 4 ч (Blaisdell F.W. (2002) *Cardiovascular Surgery*, 10:620-630). Специалист в данной области техники может контролировать и оценивать ткань или орган для определения периода времени, при котором достигается достаточное поглощение клетками, минимизируется попадание в системное кровообращение, и не происходит ишемии, или приемлемая для органа или его части ишемия является обратимой или восстановимой. Например, для построения карты окисления ткани или органа, или его части "в реальном времени" можно использовать гиперспектральную визуализацию (HSI) с цифровой обработкой света (DLP®) (Best et al. (2011) *Proc. SPIE*, 7932,

793202).

В конкретных примерах в способах в настоящем документе компарментализация ткани или органа, или его части продолжается больше 15 мин. Например, период времени для поддержания компарментализации ткани или органа, или его части, как описано в настоящем документе выше, составляет по меньшей мере или по меньшей мере примерно или до 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115 или 120 мин после инициации компарментализации и/или введения доставляемого агента. Понятно, что в присутствии агентов, которые облегчают поглощение или проникновение, период времени для поддержания компарментализации может быть короче 15 мин. Таким образом, в примерах в настоящем документе период времени для поддержания компарментализации ткани или органа, или его части составляет по меньшей мере или по меньшей мере примерно или до 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 мин или больше. В некоторых вариантах воплощения компарментализация поддерживается на протяжении по меньшей мере 30 мин, примерно 30 мин или до 30 мин. Обычно в любом из способов в настоящем документе компарментализация ткани или органа, или его части продолжается не больше 60 мин, например больше 15 мин, но меньше 60 мин.

Например, в примерах в настоящем документе, в которых печень или ее часть компарментализуют способами по настоящему документу, период времени для поддержания компарментализации печени составляет по меньшей мере или по меньшей мере примерно или до 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 или 60 мин после инициации компарментализации и/или введения доставляемого агента. Обычно в любом из способов в настоящем документе компарментализация печени или ее части продолжается не больше 60 мин, например по меньшей мере или по меньшей мере примерно 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 мин, но меньше чем 60 мин. Например, компарментализация может продолжаться или продолжаться примерно от 15 до 60 мин, от 15 до 50 мин, от 15 до 40 мин, от 15 до 30 мин, от 20 до 60 мин, от 20 до 40 мин и обычно продолжается на протяжении примерно или приблизительно 30 мин.

В некоторых примерах в настоящем документе способ, предусмотренный в настоящем документе, может дополнительно включать удаление из органа или его части, или из хирургического поля, внеклеточного доставляемого агента (т.е. той части доставляемого агента, которая была введена, но не захвачена клетками компарментализованного органа или его части). Стадия удаления может включать абсорбцию, всасывание или промывание, так что после восстановления кровообращения через сосуды с органом или его частью в системное кровообращение попадет небольшое количество доставляемого агента, или доставляемый агент не попадет в системное кровообращение совсем. Таким образом, стадию удаления осуществляют перед восстановлением кровообращения через сосуды в органе или его части.

После периода компарментализации компарментализацию органа или его части прекращают. Это осуществляют путем восстановления связи ткани или органа, или их частей с общей системой кровообращения. Например, компарментализацию прекращают путем восстановления кровообращения через сосуды органа или его части. Восстановление сосудистой изоляции можно достичь за счет удаления устройства, аппарата или прекращения применения методики, которые применяли, чтобы заблокировать кровоток в ткани или ее части. Например, зажим на паренхиму может быть снят с ткани. В других примерах можно прекратить компрессию области или части ткани. Аккуратное удаление устройства, аппарата или прекращения применения методики, которые применяли, чтобы заблокировать кровоток в ткани или органе или его части, так чтобы не произошло повреждения подлежащих ткани, сосудов, вен или артерий или протоков, находится в пределах компетентности квалифицированного лечащего врача. Например, давление зажима на паренхиму можно аккуратно понижать, чтобы контролировать восстановление кровотока в ткани, органе или их частях.

#### D. Доставляемые агенты.

Доставляемый агент для применения в способах, применениях или композициях в настоящем документе может представлять собой любую желательную молекулу нуклеиновой кислоты, или носитель, конструкцию или комплекс, содержащий любую молекулу нуклеиновой кислоты. В частности, доставляемый агент представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты или включает молекулу нуклеиновой кислоты, которая имеет желательную функцию или которая кодирует выбранный полипептид с желательной функцией. Доставляемый агент может представлять собой ДНК (например, двухцепочечную кольцевую или линейную ДНК), РНК, рибозим или аптамер. Также доставляемый агент может быть в любой форме, включая, но не ограничиваясь ими, в виде оголенной ДНК, микроРНК, малой интерферирующей РНК или антисмысловой нуклеиновой кислоты. Доставляемый агент может быть предусмотрен в виде конструкции, содержащей гетерологичную молекулу нуклеиновой кислоты. Существует целый ряд конструкций, известных специалисту в данной области техники, для доставки нуклеиновых кислот в клетки *in vitro* либо *in vivo*. Такие конструкции включают системы доставки на основе вирусов и невирусные системы доставки. Например, доставляемый агент может представлять собой конструкцию, содержащую молекулу нуклеиновой кислоты, которая доставляется в наночастице (например, в наночастице направленного действия или радиоактивно меченой наночастице), плазмиде или векторе (например, вирусный вектор или вектор экспрессии). Такие конструкции хорошо известны в данной области техники и легко могут быть приспособлены для применения с композициями и способами, описанными в настоящем документе.

Понятно, что выбор используемого доставляемого агента зависит от ткани-мишени или местоположения органа. Определение опытным путем и идентификация доставляемого агента и/или способа доставки, который совместим с поглощением клеткой, осуществляемым клетками ткани-мишени или клетками органа, находится в пределах компетентности специалиста в данной области техники. Например, специалисту в данной области техники известно, что векторы на основе ретровирусов обычно трансдуцируют только активно делящиеся клетки. Клетки печени обычно находятся в состоянии покоя, и, таким образом, для доставки вектора на основе ретровируса в клетки печени нужен способ, который включает стадию стимуляции деления клеток (например, частичная гепатэктомия). В противоположность этому, векторы на основе аденовирусов могут быть доставлены в неделящиеся клетки.

В конкретных примерах доставляемый агент, используемый в способе в настоящем документе, как правило, представляет собой такой доставляемый агент, который не будет интегрироваться в геном хозяина и содержать последовательности, обеспечивающие репликацию. В настоящем документе было обнаружено, что даже при отсутствии интеграции в геном с помощью предусмотренного в настоящем документе компарментализованного способа для доставки можно достичь устойчивой экспрессии гена введенной молекулы нуклеиновой кислоты на протяжении более чем 6 месяцев и обычно до 1 года или больше чем 1 год. При необходимости, тем не менее, в способах в настоящем документе можно использовать нуклеиновую кислоту, которая интегрируется в геном.

#### 1. Молекула нуклеиновой кислоты.

Конкретный доставляемый агент, который используется в способах, применениях или композициях в настоящем документе, представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты или включает молекулу нуклеиновой кислоты, при этом ее доставка и/или экспрессия обуславливает активность или свойство, которые являются полезными, когда присутствуют в органе-мишени или когда секретируются в кровоток. Например, доставка и/или экспрессия молекулы нуклеиновой кислоты осуществляет замену отсутствующего или дефектного (например, частично или полностью нефункционального) продукта гена, достигает сверхпродукции продукта гена, действует как ДНК вакцина, кодирует полипептид, имеющий нужный эффект или терапевтическую активность, или ингибирует экспрессию гена. Например, молекула нуклеиновой кислоты может представлять собой молекулу нуклеиновой кислоты, которая выбрана для кодирования полипептида с нужным эффектом или для нужного терапевтического исхода. В другом примере молекула нуклеиновой кислоты представляет собой ингибитор гена или продукта гена на основе нуклеиновой кислоты, такой как ингибитор транскрипции или трансляции гена. Например, доставляемый агент может представлять собой последовательность малой интерферирующей РНК (миРНК), антисмысловую последовательность или последовательность микро-РНК (микроРНК). В дополнительных примерах доставляемый агент может использоваться в целях профилактики для доставки профилактических белков. В следующем примере осуществляется доставка и/или экспрессия молекулы нуклеиновой кислоты, которая может кодировать белки для применения в сельскохозяйственных применениях, например, для улучшения образования мышц (например, путем блокирования продукции миостатина). Выбор молекулы нуклеиновой кислоты в зависимости от конкретного применения или конкретного заболевания или расстройства, которое подлежит лечению, такого как любое заболевание или расстройство, описанное в разделе G, находится в пределах компетентности специалиста в данной области техники.

Молекулу нуклеиновой кислоты можно доставить в виде оголенной ДНК или можно доставить в носителе или в виде комплекса или конструктора. Таким образом, понятно, что доставляемый агент представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты или включает молекулу нуклеиновой кислоты. Например, молекула нуклеиновой кислоты может включать вектор или плазмиду, содержащую молекулу нуклеиновой кислоты, такие как вирусный вектор или невирусный вектор. Молекула нуклеиновой кислоты может быть инкапсулирована в липосомы. Молекула нуклеиновой кислоты может быть в комплексе с другими агентами, такими как лиганды с направленным действием или другие фрагменты, и может быть доставлена в виде наночастицы.

Экспрессию молекулы нуклеиновой кислоты можно направлять промотором или энхансером для контроля или регуляции экспрессии. Промотор функционально связан с кодирующей областью. Любой сильный промотор, известный специалистам в данной области техники, может использоваться для экспрессии ДНК. Промотор может представлять собой конститутивный промотор, такой как промотор CMV, тканеспецифичный промотор, индуцибельный или регулируемый промотор. В определенном варианте воплощения молекула нуклеиновой кислоты для введения в целях генотерапии содержит индуцибельный промотор, функционально связанный с кодирующей областью, так что экспрессия нуклеиновой кислоты контролируется присутствием или отсутствием соответствующего индуктора транскрипции. Обычно промотор представляет собой индуцибельный промотор, и, чтобы сделать возможным регулируемую экспрессию кодируемого полипептида, может быть использована система экспрессии транскрипционных факторов, такая как опубликованные регулируемые тетрациклином системы или другие регулируемые системы (см., например, опубликованную международную PCT заявку № WO01/30843). Примерами других промоторов являются тканеспецифичные промоторы, такие как промоторы, описанные в патенте США № 5998205, в том числе, например, промоторы  $\alpha$ -фетопротеина, DF3, тирозиназы, СЕА, белка сурфактанта и ErbB2. Примером регулируемых систем промоторов является Tet-On (и Tet-

Off) система, доступная, например, от Clontech (Palo Alto, CA). Эта система промоторов позволяет регулировать экспрессию трансгена, контролируя ее с помощью тетрациклина или производных тетрациклина, таких как доксициклин. Другие регулируемые системы промоторов известны в уровне техники (см., например, опубликованную заявку США № 2002-0168714, озаглавленную "Регулирование экспрессии генов с использованием одноцепочечных, мономерных, лиганд-зависимых полипептидных переключателей", в которой описаны переключатели генов, содержащие лиганд-связывающие домены и домены, регулирующие транскрипцию, например, из рецепторов гормонов). Другие подходящие промоторы, которые можно использовать, включают, но не ограничиваются ими, аденовирусные промоторы, такие как аденовирусный главный поздний промотор и/или промотор E3; или гетерологичные промоторы, такие как промотор цитомегаловируса (CMV); промотор вируса саркомы Рауса (RSV); индуцибельные промоторы, такие как промотор MMT, промотор металлотиионеина; промоторы теплового шока; промотор альбумина; и промотор AroAI.

В некоторых примерах доставляемый агент в способах, применениях или композициях в настоящем документе представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты или включает молекулу нуклеиновой кислоты, которая кодирует нужный полипептид. При доставке доставляемого агента в способах в настоящем документе кодируемый полипептид может представлять собой такой полипептид, который может использоваться для биологической терапии или в качестве лекарства. Молекула нуклеиновой кислоты может кодировать любой нужный продукт гена, такой как цитокин, фактор свертывания или фактор коагуляции, гормон, фактор роста, фермент, транспортный белок, регуляторный белок, рецептор или антиген. Молекула нуклеиновой кислоты может кодировать белковые гормоны, регулирующие рост, дифференциацию или метаболизм клетки. Выбор конкретной молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей нужный терапевтический полипептид, зависит от конкретного заболевания или состояния, которое подвергается лечению, и находится в пределах компетентности специалиста в данной области техники. Например, молекула нуклеиновой кислоты кодирует инсулин, если субъект, который подлежит лечению, имеет диабет I типа, кодирует определенный фактор свертывания крови, если у субъекта гемофилия, опосредует выработку дофамина, если у субъекта болезнь Паркинсона, или кодирует рецептор LDL, если субъект, подвергающийся лечению, имеет семейную гиперхолестеринемию. Специалисту в данной области техники известно, как выбрать нужный полипептид и нуклеиновую кислоту, которая кодирует его, основываясь на конкретных потребностях субъекта, который подлежит лечению. Примеры молекул нуклеиновых кислот кодируют иммуномодулирующие белки, ферменты, гормоны, цитокины, рецептор, антитело или антиангиогенный агент. Молекула нуклеиновой кислоты может кодировать белок, который представляет собой белок слияния.

Выбранная молекула нуклеиновой кислоты может кодировать полипептид, который представляет собой иммуностимулирующий белок или который обладает иммуномодулирующими свойствами. Такие молекулы нуклеиновых кислот включают, но не ограничиваются ими, гены, которые кодируют цитокины, например интерлейкин, интерферон, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор или их варианты, например интерлейкин (IL)-1, IL-2, IL-4, IL-5, IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IFN- $\alpha$ , TNF, IL-12, IL-18 и flt3; белки, которые стимулируют взаимодействия между иммунными клетками (B7, кластер дифференциации 28 (CD28), главный комплекс гистосовместимости класса I (MHC класса I), MHC класса II, ассоциированный с процессированием антигена транспортер (TAP)); ассоциированные с опухолями антигены (иммуногенные полипептиды из антигена меланомы, распознаваемого T-клетками 1 (MART-1), gp100 (белок меланоцитов pmel-17); тирозиназа, белок, родственная тирозиназе 1, белок, родственная тирозиназе 2, рецептор меланоцит-стимулирующего гормона, меланома-ассоциированный антиген 1 (MAGE1), MAGE2, MAGE3, MAGE12, В антиген меланомы (BAGE), раковые эмбриональные антигены (GAGE), антиген рака яичек NY-ESO-1,  $\beta$ -катенин, мутированный меланома-ассоциированный антиген 1 (MUM-1), циклин-зависимая киназа 4 (CDK-4), каспаза 8, антиген, идентифицированный моноклональным антителом Ki-67 (KIA) 0205, антиген лейкоцитов человека (HLA)-A2R1701,  $\alpha$ -фетопротеин, каталитический белок теломеразы, G-250, муцин 1 (MUC-1), канцероэмбриональный белок, p53, Her2/neu, триозофосфатизомераза, контролирующий клеточное деление белок 27 (CDC-27), белок слияния рецептор липидов низкой плотности-ОВР-1-фукоза: $\beta$ -d-галактозидаза 2- $\alpha$ -1-фукозилтрансфераза (LDLR-FUT), обратная транскриптаза теломеразы и специфический мембранный антиген простаты (PSMA)), кДНК, кодирующую антитела, которые блокируют ингибиторные сигналы (блокада антигена цитотоксического Т-лимфоцита 4 (CTLA4)), хемокины (воспалительный белок макрофагов (MIP1), MIP3, лиганд CCR7 и кальретикулин) и другие белки.

Молекула нуклеиновой кислоты может кодировать полипептид, который представляет собой фактор роста или его части, которые связываются с рецептором, или рецептор фактора роста или его часть, которые связываются с лигандом. Факторы роста и рецепторы факторов роста известны в данной области техники; см., например, Baxley and Serra, *Curr. Drug Targets* 11(9): 1089-102 (2010); Lo, *Curr. Mol. Pharmacol.* 3(1):37-52 (2010); Barakat and Kaiser, *Expert Opin. Investig. Drugs* 18(5):637-46 (2009); Trojanowska and Varga, *Curr. Opin. Rheumatol.* 19(6):568-73 (2007); Jimeno and Hidalgo, *Biochim. Biophys. Acta* 1766(2):217-29 (2006); Finch and Rubin, *J. Natl. Cancer Inst.* 98(12):812-24 (2006); Lo et al., *Breast Canc. Res.*

Treat. 95(3):211-8 (2006); Schilephake, *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 31(5):469-84 (2002); George, *Urology* 60(3 Suppl. 1):115-21 (2002). Факторы роста включают, например, костный морфогенетический белок (BMP), эпидермальный фактор роста (EGF), эритропоэтин (EPO), фактор роста фибробластов (FGF), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), фактор роста гепатоцитов (HGF), инсулиноподобный фактор роста (IGF), тромбоцитарный фактор роста (PDGF), трансформирующий фактор роста  $\alpha$  и  $\beta$  и фактор роста эндотелия сосудов (VEGF). Рецепторы факторов роста включают, например, рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), рецептор фактора роста фибробластов (FGFR) или рецептор трансформирующего фактора роста (TGFR).

Молекула нуклеиновой кислоты может кодировать полипептид, который представляет собой анти-тело или фрагмент антитела, в том числе одноцепочечное антитело или антиидиопатическое антитело. Антитела известны в данной области техники; см., например, Brekke and Sandlie, *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2(1):52-62 (2003); Mellstedt, *Drugs Today* 39(Supl. C):1-16 (2003); *Therapeutic Antibodies: Methods and Protocols*; Ed. Dimitrov, A.S., Humana Press, Springer, New York, NY (2009); Zheng et al. (2007) *Cell Research*, 17:303-306. Неограничивающие примеры кодируемых антител или их фрагментов включают, например, антитимоцитарный глобулин, муромонаб, абциксимаб, адалимумаб, алемтузумаб, базиликсимаб, бевацизумаб, цетуксимаб, цертолизумаб, даклизумаб, экулизумаб, эфализумаб, гемтузумаб, ибритумомаб тиуксетан, инфликсимаб, муромонаб-CD3, натализумаб, омализумаб, паливизумаб, панитумумаб, ранибизумаб, ритуксимаб, тозитумомаб или трастузумаб.

Молекула нуклеиновой кислоты может кодировать полипептид, который представляет собой, например, фермент (например, галсульфаза, ларонидаза, N-ацетилгалактозамин 6-сульфатаза, фенилаланин-аммиак лиаза, кислая альфа-глюкозидаза, имиглуцераза, алглюкозидаза альфа), гормон (например, тиреотропин, гормон роста, инсулин, тироидный гормон, эритропоэтин), модулятор ангиогенеза, иммуномодулятор (денилейкин дифтитокс; интерлейкин-2), модулятор боли (например, NP2), белок слияния (например, белок слияния инсулиноподобного фактора роста 2 и кислой альфа-глюкозидазы (IGF2-GAA); абатасепт; алефацепт; этанерцепт), ингибитор поли (АДФ-рибоза) полимеразы (PARP), гилан или другие производные гиалуронана, или аллерген (например, арахисовый или другой пищевой аллерген), но не ограничивается ими.

Например, молекула нуклеиновой кислоты может кодировать человеческий эритропоэтин или его варианты (см., например, патент США № 4703008, номер доступа P01588), человеческий G-CSF или его варианты (см., например, номер доступа P09919); человеческий GM-CSF или его варианты (см., например, Cantrell et al. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82:6250-4; номер доступа P04141); активатор плазминогена или его варианты (см., например, номер доступа P00750); урокиназу или ее варианты (см., например, номер доступа P00749); инсулин или его варианты (см., например, патент США № 4652525, патент США № 4431740, Groskreutz et al. (1994) *J. Biol. Chem.*, 269:6241-5, номер доступа P01308); интерлейкины, такие как интерлейкин-1 или его варианты (см., например, Accession Nos. P01583, P01584), интерлейкин-2 или его варианты (см., например, номер доступа P60568, патент США № 4738927), интерлейкин-3 или его варианты (см., например, номер доступа P08700, европейский патент № EP275598 или 282185), интерлейкин-4 или его варианты (см., например, номер доступа P05112), интерлейкин 7 или его варианты (см., например, номер доступа P13232, патент США № 4965195), интерферон или его варианты, фактор VIII или его варианты (см., например, номер доступа P00451), фактор IX или его варианты (см., например, P00740), фактор фон Виллебранда или его варианты (см., например, номер доступа P04275) или человеческий гормон роста или его варианты (см., например, номер доступа P01241, P01242, патент США № 4342832).

Другие представляющие интерес молекулы нуклеиновых кислот, включают молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют антиангиогенные белки или белки, ведущие к гибели клетки. Антиангиогенные белки включают, например, METN-1, METN-2, фрагменты TrpRS, белок, родственный пролиферину, фрагмент пролактина, PEDF, вазостатин, различные фрагменты белков внеклеточного матрикса и ингибиторы факторов роста/цитокинов. Различные фрагменты белков внеклеточного матрикса включают, но не ограничиваются ими, ангиостатин, эндостатин, кининостатин, фрагмент фибриногена-E, тромбоспондин, тумстатин, канстатин и рестин. Ингибиторы факторов роста/цитокинов включают, но не ограничиваются ими, антагонисты VEGF/VEGFR, sFlt-1, sFlk, sNRP1, антагонист ангиопоэтина/tie, sTie-2, хемокины (IP-10, PF-4, Gro-бета, IFN-гамма (Mig), IFN, антагонист FGF/FGFR (sFGFR), антагонист эрфина/Eph (sEphB4 и растворимый эфрин B2), PDGF, TGF и IGF-1. Белок, ведущий к гибели клетки, представляет собой белок, который ведет к гибели клетки, например, в случае экспрессии дифтерийного токсина А или экспрессии белка, который может сделать клетки селективно чувствительными к некоторым лекарствам, например экспрессия гена тимидинкиназы вируса простого герпеса (HSV-TK) делает клетки чувствительными к противовирусным соединениям, таким как ацикловир, ганцикловир и FIAU (1-(2-дезоксидезокси-2-фтор- $\beta$ -D-арабинофуранозил)-5-иодурацил). Другие белки, ведущие к гибели клетки, включают карбоксипептидазу G2 (CPG2), карбоксилэстеразу (CA), цитозиндеаминазу (CD), цитохром P450 (сyt-450), дезоксицитидинкиназу (dCK), нитроредуктазу (NR), пурин-нуклеозид-фосфорилазу (PNP), ти-

мидинфосфорилазу (TP), тимидинкиназу вируса ветряной оспы (VZV-TK) и ксантингуанинфосфорибозилтрансферазу (XGPRТ). Другие кодируемые белки включают, но не ограничиваются ими, тимидинкиназу вируса простого герпеса (HSV-TK), которая используется в качестве защитного переключателя (см., патентную заявку США № 08/974391, поданную 19 ноября 1997 г., которая опубликована как опубликованная заявка PCT № WO99/25860), Nos, FasL и sFasR (растворимый рецептор Fas).

В других примерах в настоящем документе молекула нуклеиновой кислоты представляет собой такую молекулу нуклеиновой кислоты, которая кодирует белок, участвующий в лизосомном заболевании накопления, и, в частности, кодирует фермент, который является дефицитным при этом заболевании, включая, но не ограничиваясь ими, аспартилглюкозаминидаза,  $\alpha$ -галактозидаза А, тиоэстераза пальмитоилированных белков, трипептидил пептидаза, лизосомный трансмембранный белок, транспортер цистеина, кислая церамидаза, кислая  $\alpha$ -L-фукозидаза, защитный белок/катепсин А, кислая  $\beta$ -глюкозидаза или глюкоцереброзидаза, кислая  $\beta$ -галактозидаза, идуронат-2-сульфатаза,  $\alpha$ -L-идурунидаза, галактоцереброзидаза, кислая  $\alpha$ -маннозидаза, кислая  $\beta$ -маннозидаза, арилсульфатаза В, арилсульфатаза А, N-ацетилгалактозамин-6-сульфат сульфатаза, N-ацетилглюкозамин-1-фосфотрансфераза, кислая сфингомиелиназа, болезнь Ниманна-Пика, тип С1 (NPC-1),  $\beta$ -гексозаминидаза В, гепаран N-сульфатаза,  $\alpha$ -N-ацетилглюкозаминидаза (NaGlu), ацетил-CoA: $\alpha$ -глюкозаминид N-ацетилтрансфераза, N-ацетилглюкозамин-6-сульфат сульфатаза,  $\beta$ -глюкуронидаза и кислая липаза. Роль таких ферментов в различных лизосомных заболеваниях накопления известна специалисту в данной области техники (см., например, опубликованную патентную заявку США №№ US2008/0025952; US20120009268). Выбор фермента зависит от конкретного лизосомного заболевания накопления. Неограничивающие примеры нужных молекул нуклеиновых кислот включают любые молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют  $\beta$ -глюкуронидазу для лечения мукополисахаридоза (например, синдром Слая);  $\alpha$ -L-идурунидазу для лечения синдрома Гурлера;  $\alpha$ -L-идурунидазу для лечения синдрома Шейе или синдрома Шейе-Гурлера; идуронатсульфатазу для лечения синдрома Гунтера; гепаринсульфамидазу для лечения синдрома Санфилиппо А (MPSIIA); N-ацетилглюкозаминидазу для лечения синдрома Санфилиппо В (MPSIIB); ацетил-CoA: $\alpha$ -глюкозаминид ацетилтрансферазу для лечения синдрома Санфилиппо С (MPSIIC); N-ацетилглюкозамин-6-сульфатазу для лечения синдрома Санфилиппо D (MPSIID); галактоза-6-сульфат сульфатазу для лечения синдрома Моркио А;  $\beta$ -галактозидазу для лечения синдрома Моркио В; N-ацетилгалактозамин-4-сульфатазу для лечения синдрома Марото-Лами;  $\alpha$ -галактозидазу для лечения болезни Фабри; глюкоцереброзидазу для лечения болезни Гоше или лизосомную кислотую  $\alpha$ -глюкозидазу для лечения расстройства накопления гликогена (например, болезни Помпе).

Другие примеры представляющих интерес молекул нуклеиновых кислот включают, но не ограничиваются ими, любые молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют белок для лечения болезни Альгеймера, такой как металлоэндопептидаза, например, деградирующей амилоид-бета фермент неприлизин, деградирующий инсулин фермент инсулизин или тимет олигопептидаза; белок или пептид, который может действовать как антиретровирусный агент для лечения вирусной инфекции, такой как инфекция вирусом иммунодефицита человека (HIV), например энфувиртид (Fuzeon®); белок для лечения бокового амиотрофического склероза (ALS), такой как, например, инсулиноподобный фактор роста-1 (IGF-1), кальбиндин D28, парвальбумин, HIF1-альфа, SIRT-2, VEGF, SMN-1, SMN-2, GDNF или цилиарный нейротрофический фактор (CNF); белок, который является дефицитным у субъектов с гемофилией, такой как, например, фактор VIII или фактор IX; белок для лечения диабета I типа, такой как инсулин, расщепляемый фурином; белок для лечения семейной гиперхолестеринемии, такой как рецептор липопротеинов низкой плотности (LDLR); белок для лечения дефицита липопротеинлипазы (LPLD), такой как липопротеинлипаза (LPL); белок для лечения дефицита альфа-1-антитрипсина (AAT), такой как AAT; белок для лечения синдрома Криглера-Найяра I типа или II типа, такой как билирубин УДФ-глюкуронилтрансфераза печени или ее функциональные варианты, например UGT1A1 (Gong et al. (2001) Pharmacogenetics, 11:357-68); белок для лечения дефицита накопления гликогена IA типа, такой как глюкоза-6 фосфатаза; белок для лечения дефицита PEPCK, такой как фосфоенолпируваткарбокскиназа; белок, ассоциированный с галактоземией, такой как галактоза-1 фосфат уридил трансфераза; белок, ассоциированный с фенилкетонурией, такой как фенилаланин гидроксилаза, белок, ассоциированный с заболеванием мочи с запахом кленового сиропа, такой как дегидрогеназа разветвленных альфа-кетокислот; белок, ассоциированный с тирозинемией I типа, такой как фумарилацетоацетат гидролаза; белок, ассоциированный с метилмалоновой ацидемией, такой как метилмалонил-CoA мутаза; белок, ассоциированный с дефицитом орнитинтранскарбамилазы, такой как орнитинтранскарбамилаза; белок, ассоциированный с цитруллинемией, такой как синтетаза аргинин-янтарной кислоты; белок, ассоциированный с тяжелым комбинированным иммунодефицитом, такой как аденозиндезаминаза; белок, ассоциированный с подагрой и синдромом Леша-Нихена, такой как гипоксантингуанинфосфорибозилтрансфераза; белок, ассоциированный с дефицитом биотинидазы, такой как биотинидаза; белок, ассоциированный с болезнью Гоше, такой как бета-глюкоцереброзидаза; белок, ассоциированный с синдромом Слая, такой как бета-глюкуронидаза; белок, ассоциированный с синдромом Цельвегера, такой как 70 кДа белок мембраны пероксисомы; белок, ассоциированный с ост-

рой интермиттирующей порфирией, такой как порфобилиногендезаминаза (PBDG); белок, ассоциированный с дефицитом альфа-1-антитрипсина (эмфизема), такой как альфа-1-антитрипсин, белок, ассоциированный с раком, такой как супрессор опухоли, такой как p53; белок, кодирующий декарбоксилазу глутаминовой кислоты (GAD) для лечения болезни Паркинсона; или белок, который является дефицитным при лизосомной болезни накопления и, в частности, при синдроме Санфилиппо (также называемом мукополисахаридоз III типа, MPSIII), такой как лизосомная сульфамидаза и  $\alpha$ -N-ацетилглюкозаминидаза (NaGlu).

Альтернативно, терапевтическая нуклеиновая кислота может оказывать свой эффект на уровне РНК, например, кодируя антисмысловой транскрипт или рибозим, белок, который влияет на сплайсинг или 3'-процессинг (например, полиаденилирование), или белок, который влияет на уровень экспрессии другого гена в клетке, например, опосредуя изменение скорости накопления мРНК, изменение транспорта мРНК и/или изменение посттранскрипционной регуляции. Они включают РНК, такие как интерферирующие РНК и другие двухцепочечные РНК, антисмысловые РНК и рибозимы, которые среди других активностей могут быть направлены на мРНК, кодирующую белки, важные для пролиферации, такие как структурные белки, факторы транскрипции, полимеразы, гены, кодирующие цитотоксические белки, гены, которые кодируют генетически сконструированные цитоплазматические варианты нуклеазы (например, РНКазы А) или протеазы (например, трипсина, папаина, протеиназы К и карбоксипептидазы).

Например, молекула нуклеиновой кислоты может представлять собой ингибитор гена или продукта гена на основе нуклеиновой кислоты, такой как ингибитор транскрипции или трансляции гена. Доставляемый агент может представлять собой последовательность малой интерферирующей РНК (миРНК), последовательность антисмысловой или микро-РНК (микроРНК). РНК может иметь в длину от 10 до 30 нуклеотидов, например 19-25 или 21-25 нуклеотидов в длину. Способы сайленсинга гена, опосредованного миРНК, в которых продукты экспрессии гена являются мишенями для нуклеотидных последовательностей специфичных двухцепочечных миРНК, комплементарных нуклеотидному сегменту транскрипта целевого гена (например, комплементарные, по меньшей мере, нуклеотидному сегменту длиной 19-25), в том числе 5' нетранслируемой (UT) области, ORF или 3' UT области, известны в данной области техники (см., например, международную опубликованную заявку РСТ № WO00/44895, WO01/75164, WO01/92513 или WO01/29058). Последовательность миРНК, как правило, связывается с уникальной последовательностью в мРНК-мишени с точной комплементарностью, что приводит к деградации молекулы мРНК-мишени. Последовательность миРНК может связываться с молекулой мРНК в любом месте. Последовательности, являющиеся мишенями для миРНК, включают гены, экспрессирующие представляющий интерес полипептид, или вышележащий или нижележащий модулятор такого гена. Примеры вышележащих или нижележащих модуляторов гена включают фактор транскрипции, который связывается с промотором гена, киназу или фосфатазу, которые взаимодействуют с нужным полипептидом, и полипептиды, участвующие в регуляторных путях, способные оказывать влияние на представляющий интерес полипептид. Последовательность микроРНК, как правило, связывается с уникальной последовательностью мРНК-мишени с точной или менее точной комплементарностью, что приводит к трансляционной репрессии молекулы мРНК-мишени. Последовательность микроРНК может связываться с последовательностью мРНК в любом месте, но обычно связывается с 3' нетранслируемой областью молекулы мРНК.

Нуклеотидная последовательность миРНК или микроРНК (например, 21-25 нуклеотидов в длину) может, например, продуцироваться из вектора экспрессии путем транскрипции последовательности короткой шпилечной РНК (кшРНК), более длинной последовательности-предшественника (например, 60-80 нуклеотидов), которая далее процессируется клеточным аппаратом РНК интерференции с образованием либо последовательности миРНК, либо микроРНК. Альтернативно, нуклеотидная последовательность миРНК или микроРНК (например, 21-25 нуклеотидов в длину) может, например, быть синтезирована химическим путем. Химический синтез последовательностей миРНК или микроРНК коммерчески доступен в таких компаниях, как Dharmacon, Inc. (Lafayette, CO), Qiagen (Valencia, CA) и Ambion (Austin, TX). Способы доставки молекул миРНК или микроРНК известны в данной области техники; см., например, Oh and Park, *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 61(10):850-62 (2009); Gondi and Rao, *J. Cell Physiol.* 220(2):285-91 (2009) и Whitehead et al., *Nat. Rev. Drug. Discov.* 8(2): 129-38 (2009).

Например, молекула нуклеиновой кислоты может представлять собой последовательность антисмысловой нуклеиновой кислоты. За счет гибридизации антисмысловая нуклеиновая кислота блокирует экспрессию клеточной или патогенной мРНК. Антисмысловые молекулы нуклеиновых кислот могут, например, транскрибироваться из вектора экспрессии, чтобы продуцировать РНК, комплементарную, по меньшей мере, уникальной части мРНК-мишени и/или эндогенного гена, который кодирует мишень. Гибридизация антисмысловой нуклеиновой кислоты в специфичных клеточных условиях приводит к ингибированию белка-мишени путем ингибирования его транскрипции и/или трансляции. Примеры антисмысловых нуклеиновых кислот включают, но не ограничиваются ими, следующие продукты Isis Pharmaceuticals, Inc.: мипомерсен для высокого холестерина; ISIS-CRP<sub>Rx</sub> для заболевания коронарной артерии, воспаления и заболевания почек; ISIS-АРОСIII<sub>Rx</sub> для высокого уровня триглицеридов; ISIS-FXI<sub>Rx</sub> для расстройств свертывания; BMS-PCSK9<sub>Rx</sub> для заболевания коронарной артерии; ISIS-SGLT2<sub>Rx</sub>, ISIS-PTP1B<sub>Rx</sub>,

ISIS-GCGR<sub>Rx</sub> и ISIS-GCCR<sub>Rx</sub> для диабета 2 типа; ISIS-FGFR4<sub>Rx</sub> для ожирения; OGX-011 f, LY2181308, ISIS-EIF4E<sub>Rx</sub>, OGX-427, ISIS-STAT3<sub>Rx</sub> для рака; ISIS-SOD1<sub>Rx</sub> для ALS; ISIS-TTR<sub>Rx</sub> для TTR амилоидоза; ISIS-SMN<sub>Rx</sub> для спинальной мышечной атрофии; витравен для CMV ретинита; аликафорсен для язвенного колита; ACHN-490 для тяжелой бактериальной инфекции; ATL1102 для рассеянного склероза; EXC 001 для локального фиброза; iCo-007 для заболевания глаз и ATL1103 для акромегалии. Примеры микроПНК, которые можно вводить, используя способы в настоящем документе, включают, но не ограничиваются ими, следующие продукты Santaris Pharma: миравирсен для гепатита С; EZN-2968 для солидных опухолей; EZN-3042 для рака; EZN-4176 для андрогенового рецептора; SPC 4955 и SPC 5001 для высокого холестерина. Дополнительные терапевтические микроПНК включают следующие продукты Mima Therapeutics, Inc. для лечения рака: let-7, miR-34, miR-Rx02, miR-16, miR-Rx-01, miR-Rx-03, miR-Rx-06 и miR-Rx-07.

В других примерах молекула нуклеиновой кислоты может представлять собой рибозим (например, рибозим типа hammerhead или рибозим, содержащий шпильку), созданный либо для репарации дефектной клеточной ПНК, либо для разрушения нежелательной клеточной или кодируемой патогеном ПНК (см., например, Sullenger (1995) Chem. Biol., 2:249-253; Czubayko et al. (1997) Gene Therapy, 4:943-9; Rossi (1997) Ciba Found Symp., 209:195-204; James and Gibson (1998) Blood, 91:371-82; Sullenger (1996) Cytokines Mol. Ther., 2:201-5; Hampel (1998) Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol., 58:1-39; или Curcio et al. (1997) Pharmacol Therapy, 74:317-32).

В некоторых примерах молекула нуклеиновой кислоты кодирует обнаруживаемый полипептид. Примеры таких полипептидов включают, но не ограничиваются ими, люциферазу или флуоресцентный белок, такой как зеленый флуоресцентный белок (GFP). В конкретных примерах доставляемый агент представляет собой вирусный вектор, такой как аденовирусный вектор, который содержит молекулу нуклеиновой кислоты. Примером такого доставляемого агента является Ad-CMV-Лус (см., например, пример 1). Такой аденовирус может быть далее модифицирован таким образом, чтобы содержать еще одну или другую молекулу нуклеиновой кислоты, такую как любая известная в данной области техники или описанная выше в настоящем документе молекула нуклеиновой кислоты. Например, трансген люциферазы, экспрессируемый в нем, можно заменить или поменять таким образом, чтобы вирус содержал другую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую молекулу нуклеиновой кислоты.

## 2. Носители и конструкции, содержащие молекулу нуклеиновой кислоты.

Молекула нуклеиновой кислоты может быть предусмотрена в виде вектора, конструкции или другого носителя для доставки. Такими примерами являются вирусные векторы, невирусные векторы, наночастицы или целые клетки. Способы получения таких конструкций или носителей для доставки хорошо известны специалисту в данной области техники. Например, молекулы нуклеиновых кислот могут быть вставлены в невирусные или вирусные векторы с использованием стандартных способов, хорошо известных специалисту в данной области техники. В некоторых примерах можно использовать рутинные методы молекулярной биологии и методы рекомбинантных ДНК (см., например, Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, N.Y., 1998, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)). В других примерах молекула нуклеиновой кислоты может быть вставлена таким образом, что она находится под контролем любой соответствующей регуляторной последовательности или последовательностей. В других примерах молекулы нуклеиновых кислот вставлены как часть кассеты экспрессии, которая включает регуляторные элементы, такие как промоторы и энхансеры. Соответствующие регуляторные элементы могут быть выбраны специалистом в данной области техники на основании, например, желательного уровня экспрессии. В конкретных примерах регуляторные элементы могут быть выбраны таким образом, чтобы включать тканеспецифичные промоторы, такие как промоторы, специфичные для печени, чтобы ограничить экспрессию гена экспрессией в тканеспецифичных клетках.

### а. Вирус и вирусные векторы.

Вирус можно использовать в способах, применениях и композициях в настоящем документе в качестве доставляемого агента, где последовательность экзогенной нуклеиновой кислоты вставлена в вирусный вектор. Вирусы используют для доставки молекул нуклеиновых кислот *in vivo*, потому что они эффективно осуществляют перенос вирусной ДНК в клетки-хозяева, они могут инфицировать и захватываться специфичными клетками-мишенями в зависимости от вирусных белков прикрепления (например, белки капсида или гликопротеины), и их можно модифицировать с целью удаления несущественных генов и добавления гетерологичных молекул нуклеиновой кислоты. Специалистам в данной области техники известно много вирусных векторов. Примеры вирусов, которые можно использовать в способах в настоящем документе, включают, но не ограничиваются ими, аденовирусы, аденоассоциированные вирусы, альфавирусы, бакуловирусы, гепаднавирусы, бакуловирусы, поксвирусы, герпесвирусы, ретровирусы, лентивирусы, ортомиксовирусы, паповавирусы, парамиксовирусы и паровирусы. В конкретных примерах вирус может представлять собой аденовирус. Выбор вируса находится в пределах компетентности специалиста в данной области техники, и выбор вируса зависит от целого ряда факторов, таких как желательность репликации или интеграции вирусной ДНК, тропность вируса и/или иммуногенность вируса. Такие вирусы и их производные хорошо известны и доступны специалисту в данной области тех-

ники. Например, множество вирусов доступны из Американской коллекции типовых культур (ATCC, Rockville, Md.) или от коммерческих поставщиков (например, Vector Biolabs, Philadelphia, PA; Applied Biological Materials, Inc., Richmond, British Columbia, Canada).

Вирусные векторы для применения с целью получения рекомбинантных вирусов включают вирусы, компетентные к репликации, и дефектные по репликации. В случае дефектных по репликации вирусов, вирус, как правило, не имеет одного или нескольких генов, ассоциированных с вирусной репликацией, и не может реплицироваться в первом цикле инфекции. В некоторых случаях, для того чтобы получить дефектные по репликации вирусы, нужны векторы, осуществляющие перенос, упаковывающие векторы или вирус-помощник. Например, вектор, осуществляющий упаковку, может быть предусмотрен в виде космиды, или может быть использована клеточная линия, которая обеспечивает вирусные структурные белки для упаковки дефектного вектора.

Вирусные векторы, используемые в способе в настоящем документе, также могут содержать кассеты экспрессии, которые включают регуляторные элементы, такие как промоторы и энхансеры, функционально связанные с выбранным трансгеном. Как обсуждалось выше, можно использовать любой подходящий промотор. Подходящие промоторы и энхансеры широко доступны в данной области техники для применения в выбранных вирусных векторах. Как правило, промотор представляет собой конститутивный промотор. Примеры промоторов включают, но не ограничиваются ими, промотор CMV, укороченный промотор CMV, промотор сывороточного альбумина человека или промотор  $\alpha$ -1-антитрипсина. Например, промотор представляет собой укороченный промотор CMV, в котором удален сайт связывания с известными транскрипционными репрессорами. В других примерах промотор представляет собой индуцибельный промотор. Например, промотор представляет собой индуцируемый экдизоном промотор. Другие примеры промоторов включают регулируемые стероидами промоторы, такие как, регулируемые эстрогеном и андрогенами промоторы, и промоторы металлотioneинов. Энхансер может представлять собой тканеспецифичный или не тканеспецифичный энхансер. Например, энхансер представляет собой элемент энхансер, специфичный для печени. Примеры элементов энхансеров включают, но не ограничиваются ими, энхансеры сывороточного альбумина человека (HAS), энхансеры протромбина человека (HPT), энхансеры  $\alpha$ -1-микроглобулина, интронные энхансеры альдолазы и печеночную контролируемую область аполипопротеина E.

#### i. Аденовирус.

Аденовирусы представляют собой вирусные векторы, которые можно использовать в качестве доставляемых агентов, содержащих представляющую интерес молекулу нуклеиновой кислоты, в способах, применениях и композициях в настоящем документе. Аденовирус представляет собой ядерный ДНК вирус, имеющий геном размером примерно 36 т.н., хорошо охарактеризованный в исследованиях в рамках классической генетики и молекулярной биологии (Horwitz, M.S., "Adenoviridae and Their Replication", в *Virology*, 2nd edition, Fields, B.N., et al., eds., Raven Press, New York, 1990). Геном разделяют на ранние (известные как E1-E4) и поздние (известные как L1-L5) транскрипционные единицы, относящиеся к образованию двух классов вирусных белков, различающихся по времени экспрессии. Разделяет эти события репликация вирусной ДНК.

Аденовирусы демонстрируют природную тропность по отношению к эпителиальным клеткам дыхательных путей и желудочно-кишечного тракта. Аденовирус также может инфицировать клетки печени, такие как гепатоциты и эндотелиальные клетки, что может произойти при клиренсе вируса в печень после системного введения. В частности, в способах в настоящем документе непосредственная инъекция в паренхиму облегчает селективное поглощение гепатоцитами в печени. Основание пентон и фибробелки на поверхности вируса обуславливают тропность вируса. Для обеспечения эффективного проникновения в клетку необходимы множественные взаимодействия между аденовирусными частицами и клеткой-хозяином (Nemerow (2000) *Virology* 274:1-4). Для подгруппы С аденовирусов, таких как аденовирусы 2 и 5 (Ad2 или Ad5), путь проникновения вируса был хорошо охарактеризован, и считается, что в него вовлечены два отдельных события, связанных с клеточной поверхностью. Первое, высоко аффинное взаимодействие представляет собой взаимодействие между аденовирусным фибробелком выступа и рецептором коксаки-аденовируса (CAR), которое опосредует прикрепление аденовирусной частицы к поверхности клетки. Последующая ассоциация пентона с интегринами  $\alpha_v\beta_3$  и  $\alpha_v\beta_5$  поверхности клетки, которые действуют как корецепторы, потенцирует интернализацию вируса. CAR, который экспрессируется во многих тканях человека, в том числе в эпителиальных клетках легких (Bergelson et al., (1997) *Science* 275: 1320-1323), функционирует в качестве клеточного рецептора для большинства аденовирусных подгрупп, за исключением подгруппы В (Bergelson et al., (1997) *Science* 275: 1320-1323; Roelvink et al., (1998) *J. Virol.* 72: 7909-7915).

Аденовирус включает больше 50 серотипов, которые сгруппированы в шесть отдельных подгрупп, от А до F. Любые из этих серотипов аденовирусов, которые доступны из Американской коллекции типовых культур (ATCC, Rockville, Md.) и от других коммерческих и не коммерческих поставщиков, можно напрямую использовать в способах в настоящем документе или можно использовать в качестве источника для дальнейших модификаций, как известно в данной области техники. Также любой другой серотип

аденовируса, доступный из любого другого источника, можно использовать или далее модифицировать. Например, аденовирус может быть из подгруппы А (например, серотипы 12, 18, 31), подгруппы В (например, серотипы 3, 7, 11а, 11р, 14, 16, 21, 34, 35, 50), подгруппы С (например, серотипы 1, 2, 5, 6), подгруппы D (например, серотипы 8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 19р, 20, 22-30, 32, 33, 36-39, 42-49, 51), подгруппы Е (например, серотипы 4), подгруппы F (например, серотипы 40, 41) или иметь любой другой аденовирусовый серотип. В некоторых вариантах воплощения аденовирус принадлежит к подгруппе С аденовирусов или происходит от аденовируса подгруппы С. Подгруппа С аденовирусов включает, но не ограничивается ими, Ad2 и Ad5.

Аденовирусовые векторы доступны в данной области техники (например, доступны из Американской коллекции типовых культур (ATCC, Rockville, Md.), и последовательности белков аденовирусов дикого типа для множества различных серотипов аденовирусов хорошо известны в данной области техники (см., например, Roberts et al. (1984) *J. Biol. Chem.*, 259:13968-13975; Chroboczek et al. (1992) *Virology*, 186:280-285; Sprengel et al. (1994) *J. Virol.*, 68:379-389; Chillon et al. (1999) *J. Virol.*, 73:2537-2540; Davison et al. (1993) *J. Mol. Biol.*, 234:1308-1316; [www.binf.gmu.edu/wiki/index.php/Human\\_Adenovirus\\_Genome\\_Sequences\\_and\\_Annotations](http://www.binf.gmu.edu/wiki/index.php/Human_Adenovirus_Genome_Sequences_and_Annotations)). Аденовирусовые векторы широко доступны специалисту в данной области техники, например, из Американской коллекции типовых культур (ATCC) или от других коммерческих или некоммерческих поставщиков. Из ATCC аденовирусы доступны под номерами ATCC от VR-1 до VR-1616. Например, аденовирус типа 2 дикого типа доступен из ATCC как VR-846, и аденовирус типа 5 доступен как VR-5 и VR-1082. Можно получить любое количество рекомбинантных или модифицированных аденовирусов, которые происходят от любых серотипов аденовирусов, как описано в данной области техники и в настоящем документе, или с помощью любого подходящего способа, известного специалисту в данной области техники.

Аденовирусовые векторы имеют несколько преимуществ для применения в качестве носителей для доставки гена, включая тропность по отношению как к делящимся, так и к неделящимся клеткам, минимальный патогенный потенциал, способность к репликации с высоким титром для получения материала вектора и возможность включения больших вставок (см., например, Berkner (1992) *Curr. Top. Micro. Immunol.*, 158:39-66; Jolly et al. (1994) *Cancer Gene Therapy*, 1:51-64).

Например, аденовирусовые векторы включают дефектный аденовирусовый вектор, содержащий по меньшей мере одну делецию в первом районе ранних генов (E1-E4). Модификации аденовирусовых векторов включают делеции, известные в данной области техники, такие как делеции в одном или нескольких кодирующих районах E1, E2a, E2b, E3 или E4. Например, аденовирусовые векторы для генотерапии могут быть получены путем замены генов E1, E2a, E2b, E3 и/или E4 на гетерологичную молекулу нуклеиновой кислоты. Делецию можно осуществить, используя рестрикционные эндонуклеазы. Например, район E1a можно удалить, используя подходящие сайты рестрикционных эндонуклеаз в районе E1a. Часто, часть E3 также удаляют с использованием рестрикционной эндонуклеазы, чтобы обеспечить вставку большего фрагмента чужеродной ДНК, но в то же время необходимо удовлетворять ограничениям по размеру для упаковки в новые вирусные частицы. Благодаря делеции этих областей, клонирующая емкость аденовирусового вектора составляет примерно 8 т.н. Такие аденовирусовые векторы, как правило, относятся к дефектным по репликации аденовирусам по меньшей мере из-за одной делеции в первой вирусном районе ранних генов, таком как E1, который включает районы E1a и E1b.

Делеция ранних генов, таких как вирусный район E1, приводит к получению рекомбинантного дефектного по репликации аденовируса, неспособного продуцировать инфекционные вирусные частицы в инфицируемых впоследствии клетках-мишенях. Таким образом, для репликации генома аденовируса с удаленными ранними генами, например репликации генома аденовируса с удаленным E1, и для продуцирования вирусных частиц требуется дополняющая система, которая обеспечивает отсутствующий продукт гена. Например, комплементация E1, как правило, обеспечивается за счет клеточной линии, экспрессирующей E1, такой как упаковывающая линия клеток человеческой эмбриональной почки, т.е. линии эпителиальных клеток, называемой 293 (хранится в ATCC под номером CRL-1573). Клеточная линия 293 содержит район E1 аденовируса, который обеспечивает продукты генов района E1 для "поддержания" роста вируса с делецией E1 в клеточной линии (см., например, Graham et al., *J. Gen. Virol.* 36: 59-71, 1977). Дополнительно сообщалось о клеточных линиях, которые используются для получения дефектного аденовируса, имеющего часть района E4 аденовируса (см., например, международную опубликованную заявку № WO 96/22378). Район E3 также может быть удален из вектора, но, поскольку он не нужен для получения вектора, он может не присутствовать в дополняющей продуцирующей клетке.

Преимущество использования дефектных по репликации вирусов в качестве векторов состоит в том, что степень их распространения в другие типы клеток ограничена, поскольку они могут реплицироваться в первично инфицированной клетке, но не способны образовывать новые инфекционные вирусные частицы. Также было описано множество дефектных аденовирусовых векторов и дополняющих клеточных линий (см., например, опубликованную заявку № WO 95/34671, патент США № 5994106). Создание дефектных по репликации аденовирусов было описано в литературе (Berkner et al., *J. Virol.* 61:1213-20 (1987); Massie et al., *Mol Cell Biol.* 6:2872-83 (1986); Haj-Ahmad et al., *J. Virol.* 57:267-74 (1986); Davison et al., *J. Virol.* 61:1226-39 (1987); Zhang et al., *BioTechniques* 15:868-72 (1993); Berkner (1983) *Nuc. Ac-*

ids Res. 11:6003; Ghosh-Choudhury (1987) Biochem. Biophys. Res. Commun., 147:964; Gilardi et al. (1990) FEBS Lett. 267:60; Mittal (1993) Virus Res. 28:67; Yang (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:4601; и международная опубликованная заявка PCT WO1995/026411).

Аденовирусные векторы также включают "gutless" или "guttled" векторы, в которых все вирусные гены удалены и остались только районы ITR, необходимые для размножения вектора, и  $\psi$ . Такие аденовирусные векторы называются псевдоаденовирусные векторы (PAV), потому что они получены из генома аденовируса, который содержит минимальные цис-действующие нуклеотидные последовательности, необходимые для репликации и упаковки генома вектора. PAV векторы содержат нуклеотидные последовательности 5' инвертированного концевой повтора (ITR) и 3' ITR, который содержит точку начала репликации, и цис-действующие последовательности нуклеотидов, необходимые для упаковки генома PAV. Они могут быть модифицированы таким образом, чтобы содержать одни или несколько трансгенов с соответствующими регуляторными элементами (например, промотор или энхансеры). PAV имеют намного большую емкость, чем 8 т.н., размером вплоть до 36 т.н., поскольку они содержат делеции большинства вирусных кодирующих последовательностей (см., например, патент США № 5882887 или 567048; опубликованную заявку PCT №№ WO96/40955, WO97/25466, WO95/29993, WO97/00326; Morral et al. (1998) Hum. Gene Ther., 10:2709-2716, Kochanek et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci., 93:5731-5736; Parks et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci., 93:13565-13570; Lieber et al. (1996) J. Virol., 70:8944-8960 или Fisher et al. (1996) J. Virol., 217:11-22).

PAV получают путем коинфекции продуцирующих клеток вирусом-"помощником" (например, используя аденовирусный вектор с делецией E1), где упаковывающие клетки экспрессируют продукты гена E1. Вирус-помощник транс-комплементирует отсутствующие функции аденовируса, в том числе продукцию вирусных структурных белков, необходимых для сборки частицы. Например, геном аденовирусного вектора-помощника и геном "gutless" аденовирусного вектора доставляют в упаковывающие клетки. Клетки поддерживают при стандартных поддерживающих условиях или условиях роста, при этом геном вектора-помощника и упаковывающие клетки вместе обеспечивают дополняющие белки для упаковки частиц аденовирусного вектора. Такие частицы "gutless" аденовирусного вектора выделяют стандартными методами. Геном вектора-помощника можно доставить в форме плазмиды или аналогичной конструкции стандартными методами трансфекции, или можно доставить путем инфицирования вирусной частицей, содержащей геном. Такая вирусная частица обычно называется вирус-помощник. Аналогично, геном "gutless" аденовирусного вектора можно доставить в клетку путем трансфекции или вирусной инфекции.

Аденовирусы также включают аденовирусы с зависимой от условий репликацией, которые представляют собой вирусы, реплицирующиеся в некоторых типах клеток или тканей, но не в других типах, как результат помещения аденовирусных генов, необходимых для репликации, под контроль гетерологичного промотора (как обсуждалось выше; см. также патент США № 5998205, патент США № 5801029 и заявку США № 10/081,969, опубликованную как US 2003-0104625, и соответствующую опубликованную международную PCT заявку № WO 2002/067861).

Аденовирусы также включают аденовирусы, которые были модифицированы таким образом, чтобы содержать лиганд направленного действия для увеличения инфицирования специфичных клеток-мишеней, которые экспрессируют рецепторы (белки, липиды, углеводы и их части) для лиганда направленного действия, например, для изменения тропности вируса. Несмотря на то, что аденовирусные векторы и другие инструменты на основе аденовирусов очень перспективны для терапевтических применений, их использование ограничено широким распространением в тканях CAR, что ограничивает доставку аденовирусных векторов в специфичные типы клеток. Более того, отсутствие CAR и/или рецепторов  $\alpha_v$  интегрин на некоторых клетках *in vivo* ограничивает число типов клеток или тканей, которые могут являться мишенями для аденовирусных векторов. Таким образом, аденовирусы также включают аденовирусы, которые были модифицированы путем снижения или устранения связывания с нативными рецепторами и/или изменения белков капсида, например петли HI, C-конца фибер-белка, петли L1 гексона или петли RGD основания пентона или белка IX капсида, для включения лигандов направленного действия для нужного клеточного рецептора или тканеспецифичного рецептора (см., например, Krasnykh et al. (2000) Mol. Ther., 1:391-405; Wickham et al. (2000) Gene Ther., 7:110-4; Dmitriev et al. (1998) J. Virol., 72:9706-12; Mizuguchi et al. (2004) Hum. Gene Ther., 15:1034-44; Wickham et al. (1997) J. Virol., 71:8221-9; Curiel (1999) Ann NY Acad. Sci., 886:158-71). Белок капсида может быть модифицирован, например, путем добавления лиганда направленного действия или замены фибер-белка другим типом фибер-белка аденовирусов. Лиганд направленного действия может представлять собой любой белок или его часть, которые связываются с фрагментом в клетке или на клетке, таким как белок клеточной поверхности, липид, углевод или другой фрагмент. Например, лиганд направленного действия включает, но не ограничивается ими, факторы роста, молекулы адгезии, цитокины, белковые гормоны, нейропептиды (нейротрансмиттеры) и одноцепочечные антитела или их подходящие части. В других примерах аденовирусные векторы могут быть конъюгированы с адапторными молекулами, такими как антитела и белки слияния, содержащие анти-Ad одноцепочечное антитело (scFv) или внеклеточный домен CAR с лигандом

направленного действия, или могут быть химически модифицированы полимерами, например фрагментами полиэтиленгликоля (PEG), которые содержат лиганды направленного действия (см., например, Mizuguchi et al. (2004) *Hum. Gene Ther.*, 15:1034-44; Eto et al. (2008) *Int. J. Pharm.*, 354:3-8).

Любые из приведенных выше аденовирусов или любые известные в данной области техники аденовирусы могут быть модифицированы таким образом, чтобы содержать представляющую интерес гетерологичную молекулу нуклеиновой кислоты для применения в качестве доставляемого агента в настоящем документе. Аденовирус, содержащий представляющую интерес последовательность гетерологичной нуклеиновой кислоты, можно получить любым методом, известным специалистам в данной области техники (Levrego et al., *Gene* 101 (1991) 195, EP 185 573; Graham, *EMBO J.* 3 (1984) 2917; международная опубликованная заявка РСТ № WO95/26411). В частности, такие вирусы можно получить путем гомологичной рекомбинации между аденовирусным вектором и плазмидой, несущей последовательность гетерологичной ДНК. Гомологичная рекомбинация может происходить после котрансфекции аденовирусного вектора и плазмиды в соответствующую клеточную линию. Используемая клеточная линия обычно является трансформируемой. Трансфекцию можно осуществить в присутствии реагента, который направляет проникновение аденовирусных частиц в продуцирующие клетки. Такие реагенты включают, но не ограничиваются ими, поликатионы и бифункциональные реагенты. В некоторых примерах, если аденовирус представляет собой дефектный аденовирус (из-за делеции раннего гена или фибер-белка), клеточная линия также содержит последовательности, которые могут дополнить часть дефектного генома аденовируса, например, в интегрированной форме, чтобы избежать рисков рекомбинации. Примеры дополняющих клеточных линий включают, но не ограничиваются ими, линию клеток человеческой эмбриональной почки 293 (Graham et al., *J. Gen. Virol.* 36 (1977) 59), которая содержит левую часть генома аденовируса Ad5. Дополняющая клетка также включает, например, клетку клеточной линии PER.C6, которая содержит аденовирусный ген E1 (PER.C6 доступна, например, от Crucell, The Netherlands; имеет номер доступа ECACC 96022940; см., также Fallaux et al. (1998) *Hum. Gene Ther.* 9:1909-1907; см., также, патент США № 5994128) или клетку AE1-2a (см., Gorziglia et al. (1996) *J. Virology* 70:4173-4178 и Von Seggern et al. (1998) *J. Gen. Virol.* 79:1461-1468)). Далее, размножившиеся аденовирусы выделяют и очищают обычными методами молекулярной биологии.

Ссылки, иллюстрирующие применение аденовирусов в генотерапии включают, но не ограничиваются ими, Vorburger and Hunt (2002) *The Oncologist*, 7:46-59; Breyer et al. (2001) *Current Gene Therapy*, 1:149-162; Shirakawa (2009) *Drugs News Perspectives*, 22:140-5; Wang et al. (2005) *Gene Therapy and Mol. Biology*, 9:291-300; и Sheridan (2011) *Nature Biotechnology*, 29:121) ii. Аденоассоциированный вирус (AAV)

Вирусные векторы для применения в качестве доставляемого агента в способах, композициях и применениях в настоящем документе включают аденоассоциированный вирус (AAV). AAV представляет собой одноцепочечный ДНК парвовирус человека, геном которого имеет размер 4,6 т.н. Геном AAV содержит два основных гена: ген гер и ген сар. Ген гер кодирует белки Rep (Rep 76, Rep 68, Rep 52 и Rep 40). Ген сар ответственен за репликацию, высвобождение, транскрипцию и интеграцию AAV, так как белки сар формируют вирусную частицу AAV. AAV получил свое название из-за своей зависимости от аденовируса или другого вируса-помощника (например, герпесвирусов) в отношении обеспечения продуктами генов, необходимыми для осуществления продуктивной инфекции AAV (т.е. для воспроизведения себя в клетке-хозяине). В отсутствие вируса-помощника AAV интегрирован в виде провируса в хромосому клетки-хозяина до тех пор, пока не будет высвобожден из нее путем суперинфекции клетки-хозяина вирусом-помощником, которым обычно является аденовирус (Muzyczka (1992) *Curr. Top. Micro. Immunol.*, 158:97-129).

AAV вирусы могут быть интегрированы в клеточный геном. Механизм интеграции опосредован наличием инвертированных концевых повторов (ITR) на обоих концах генома AAV, который содержит цис-действующие нуклеотидные последовательности, необходимые для репликации, высвобождения, упаковки и интеграции вируса. Функция интеграции ITR, опосредованная трансдействующим белком гер, обеспечивает интеграцию генома AAV в клеточную хромосому после инфекции в отсутствие вируса-помощника. Сайт интеграции для AAV точно установлен и локализуется в 19 хромосоме человека (Kotin et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87:2211-2215). Знание сайта интеграции снижает опасность случайных инсерционных событий в клеточный геном, которые могут привести к активации или инактивации генов хозяина или прервать кодирующие последовательности. AAV также используется для применений в генотерапии, потому что диапазон его хозяев является широким, и он обладает тропностью по отношению ко многим типам клеток. AAV также могут инфицировать как неделящиеся, так и делящиеся клетки.

AAV векторы могут происходить от любых встречающихся в природе серотипов AAV, в том числе AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7, AAV-8 или AAV-9. Такие вирусы хорошо известны и доступны специалисту в данной области техники (см., например, Grimm et al. (2003) *Current Gene Therapy*, 3:281-304; Muramatsu et al. (1996) *Virol.*, 221:208-217; Chiorini et al. (1997) *J. Virol.*, 71:6823-6833; Chiorini (1999) *J. Virol.*, 73:1309-1319; Rutledge et al. (1998) *J. Virol.*, 72:309-319; Xiao et al. (1999) *J. Virol.*, 73:3994-4003; Gao et al. (2002) *Proc Natl. Acad. Sci.*, 99:11854-11859; Kotin (1994) *Human Gene*

Therapy, 5:793-801). Другие серотипы также известны и доступны и включают серотипы от AAV-8 до AAV-12. Например, многие AAV векторы доступны из Американской коллекции типовых культур (ATCC, Rockville, Md.; см., например, VR-197, VR-645, VR-646, VR-680, VR-681, VR-1449, VR-1523, VR-1616). Также доступны совместимые клетки-хозяева и вирус-помощник. AAV векторы также включают "псевдотипированные" AAV векторы, в которых геном AAV-2 вектора кросс-упакован в капсиды AAV других серотипов (Burger et al. (2004) *Mol. Ther.*, 10:302-17; патент США № 7094604). Такие псевдотипированные AAV векторы не имеют ограничений, которые имеют векторы, происходящие от серотипа AAV-2, такие как неэффективность трансдукции некоторых клеток, таких как клетки печени и мышц.

Многие AAV векторы после способов доставки, с помощью которых достигается системная экспрессия, демонстрируют трансдукцию во множестве тканей, таких как скелетные и сердечные мышцы. Они включают, например, серотипы AAV 6, 8 и 9. В частности, AAV векторы включают аденоассоциированный вирус серотипа 9 (AAV-9; номер доступа GenBank AY530629.1; Gao et al. (2004) *J. Virol.*, 78:6381-6388). AAV-9 представляет собой вектор, который может проходить через гематоэнцефалический барьер для направленной доставки в центральную нервную систему (ЦНС) (см., например, Foust et al, (2009) *Nature Biotechnology*, 27:59-65; Duque et al. (2009) *Mol. Ther.*, 17:1187-1196). Таким образом, в примерах нейродегенеративных заболеваний или других заболеваний в настоящем документе, которые затрагивают или связаны с головным мозгом или ЦНС, в качестве доставляемого агента для системной доставки может использоваться AAV-9, кодирующий нужный белок (например, для доставки в печень или ее часть для экспрессии в кровь).

AAV векторы включают рекомбинантные AAV векторы, которые содержат представляющую интерес гетерологичную нуклеиновую кислоту. Методики получения таких векторов известны специалисту в данной области техники. Например, в стандартных подходах для получения AAV векторов требуется осуществить трансфекцию клетки-хозяина геномом AAV вектора, содержащим представляющую интерес молекулу нуклеиновой кислоты, фланкированную последовательностями ITR AAV, трансфекцию клетки-хозяина плазмидой, кодирующей необходимые гены транс-действующих белков гер и сар AAV, и инфицирование трансдуцированной клетки вирусом-помощником, чтобы обеспечить необходимые транс-действующие не-AAV вспомогательные функции (Muzyczka (1992) *Surf. Top. Micro. Immunol.*, 158:97-129; патент США № 5139941). Вирус-помощник может представлять собой аденовирус или другой вирус-помощник. Белки вируса-помощника активируют транскрипцию гена гер AAV, и белки гер далее активируют транскрипцию генов сар AAV. Белки сар далее используют последовательности ITR для упаковки генома AAV в вирусную частицу.

Альтернативно, рекомбинации вирионов AAV можно помочь, используя плазмиду, содержащую вспомогательные функциональные гены, в комбинации с инфицированием одним из хорошо известных вирусом-помощников, которые могут использоваться в качестве источника репликативных функций (см., например, патенты США №№ 5622856 и 5139941). Аналогично, специалист в данной области техники может использовать плазмиду, содержащую дополнительные функциональные гены, в комбинации с инфицированием AAV дикого типа, чтобы обеспечить необходимые репликативные функции. Также можно использовать способ тройной трансфекции для получения рекомбинантных гAAV вирионов, представляющий собой способ, который не требует вируса-помощника (см., например, патент США 6001650). Это достигается за счет применения трех векторов для получения рекомбинантного гAAV вириона: AAV функционального вектора-помощника, дополнительного функционального вектора и гAAV вектора.

Ссылки, иллюстрирующие применение AAV вирусов в генотерапии, включают, но не ограничиваются ими, Sheridan (2011) *Nature Biotechnology*, 29:121.

### iii. Ретровирус.

Вирусные векторы для применения в качестве доставляемого агента в способах, композициях и применениях в настоящем документе включают ретровирусные векторы (см., например, Miller (1992) *Nature*, 357:455-460). Ретровирусные векторы хорошо подходят для доставки нуклеиновой кислоты в клетки, благодаря их способности доставлять не перестроенный ген в виде единичной копии в широкий диапазон соматических клеток крыс, приматов и человека. Ретровирусные векторы интегрируются в геном клеток-хозяев. В отличие от других вирусных векторов, они инфицируют только делящиеся клетки.

Ретровирусы представляют собой РНК вирусы, у которых вирусный геном представлен РНК. Когда клетка-хозяин инфицируется ретровирусом, геномная РНК обратно транскрибируется в интермедиат ДНК, который очень эффективно интегрируется в хромосомную ДНК инфицированной клетки. Этот интегрированный интермедиат ДНК называется провирусом. Транскрипция провируса и сборка в инфекционный вирус происходит в присутствии соответствующего вируса-помощника или в клеточной линии, содержащей соответствующие последовательности, делающие возможным инкапсуляцию без одновременной (сопутствующей) продукции контаминирующего вируса-помощника. Вирус-помощник не требуется для продукции рекомбинантного ретровируса, если последовательности для инкапсуляции обеспечиваются ко-трансфекцией соответствующих векторов.

Ретровирусный геном и провирусная ДНК имеют три гена: gag, pol и env, которые фланкированы двумя последовательностями длинных концевых повторов (LTR). Ген gag кодирует внутренние струк-

турные белки (белки матрикса, капсида и нуклеокапсида), и ген *env* кодирует вирусные гликопротеины оболочки. Ген *pol* кодирует продукты, которые включают РНК-зависимую ДНК-полимеразу, обратную транскриптазу, которая транскрибирует вирусную РНК в двухцепочечную ДНК, интегразу, которая осуществляет интеграцию ДНК, продуцированной обратной транскриптазой, в хромосомную ДНК хозяина, и протеазу, которая процессирует кодируемые гены *gag* и *pol*. 5' и 3' LTR служат для транскрипции и полиаденилирования РНК вириона. LTR содержат все другие цис-действующие последовательности, необходимые для вирусной репликации.

Ретровирусные векторы описаны Coffin et al., *Retroviruses*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1997). Примером ретровирусов является вирус мышинного лейкоза Молони (MMLV) или вирус мышинных стволовых клеток (MSCV). Ретровирусные векторы могут быть компетентны к репликации или с дефектами репликации. Как правило, ретровирусный вектор имеет дефекты репликации, его кодирующие гены, необходимые для дополнительных раундов репликации вириона и упаковки, удалены или заменены на другие гены. Следовательно, вирусы не способны продолжать их типичный литический цикл после инфицирования первоначальной клеткой-мишенью. Такие ретровирусные векторы и необходимые агенты для получения таких вирусов (например, упаковывающие клеточные линии) коммерчески доступны (см., например, ретровирусные векторы и системы доступны от Clontech, например ретровирусные векторы и системы, имеющие номер по каталогу 634401, 631503, 631501, и другие, Clontech, Mountain View, CA).

Такие ретровирусные векторы могут быть получены в виде доставляемых агентов путем замены вирусных генов, необходимых для репликации, на молекулу нуклеиновой кислоты, которая должна быть доставлена. Полученный геном содержит LTR на каждом конце, а также желательный ген или гены между ними. Способы получения ретровирусов известны специалисту в данной области техники (см., например, международная опубликованная заявка РСТ № WO05/26411). Ретровирусный вектор может быть получен в упаковывающей клеточной линии, содержащей плазмиду-помощник или плазмиды-помощники. Упаковывающие клеточные линии обеспечивают вирусные белки, необходимые для образования капсида и созревания вириона вектора (например, гены *gag*, *pol* и *env*). Как правило, используют по меньшей мере две отдельные плазмиды-помощники (отдельно содержащие гены *gag* и *pol*; и ген *env*), так что рекомбинация между плазмидными векторами не может произойти. Например, упаковывающую клеточную линию можно трансфицировать ретровирусным вектором, используя стандартные способы трансфекции, такие как трансфекция, опосредованная фосфатом кальция. Упаковывающие клеточные линии хорошо известны специалисту в данной области техники и коммерчески доступны. Примером упаковывающей клеточной линии является упаковывающая клеточная линия GP2-293 (номера по каталогу 631505, 631507, 631512, Clontech). После периода времени, достаточного для продукции вириона, вирус собирают. При желании, собранный вирус можно использовать для инфицирования второй упаковывающей клеточной линии, например, для получения вируса с другой тропностью в хозяине. Конечным результатом является некомпетентный к репликации рекомбинантный ретровирус, который включает представляющую интерес нуклеиновую кислоту, но не имеет другие структурные гены, так что новый вирус не может образовываться в клетке-хозяине.

Ссылки, иллюстрирующие применение ретровирусных векторов в генотерапии, включают: Clowes et al., (1994) *J. Clin. Invest.* 93:644-651; Kiem et al., (1994) *Blood* 83:1467-1473; Salmons and Gunzberg (1993) *Human Gene Therapy* 4:129-141; Grossman and Wilson (1993) *Curr. Opin. in Genetics and Devel.* 3:110-114; Sheridan (2011) *Nature Biotechnology*, 29:121; Cassani et al. (2009) *Blood*, 114:3546-3556.

#### iv. Лентивирус.

Лентивирусы представляют собой подкласс ретровирусов. Примерами лентивирусов являются HIV, SIV и FIV. В отличие от других ретровирусов, лентивирусы способны интегрироваться в геном неделящихся клеток. Таким образом, например, сообщалось, что лентивирусные векторы способны эффективно и перманентно доставлять гены в первичные клетки печени, интегрируясь в геном неделящихся первичных клеток печени (Lewis and Emerman (1994) *J. Virol.*, 68:510-6). На лентивирусные векторы также не действует механизм выключения транскрипции, который действует для MMLV ретровирусных векторов. Лентивирусы отличаются от других ретровирусов тем, что они имеют кариофильные детерминанты, содержащиеся в нескольких белках вириона, таких как матриксный белок или белок VPR, которые взаимодействуют с аппаратом ядерного импорта и опосредуют активную транспортировку вирусного прединтеграционного комплекса через ядерную пору. Поэтому лентивирусная интеграция в геном клеток-хозяев не зависит от деления клетки.

Аналогично другим ретровирусам, лентивирусы содержат гены *gag*, *pol* и *env*, которые являются основными генами, кодирующими вирусные белки. Кроме того, также есть другие дополнительные гены, которые участвуют в регуляции синтеза и процессинге вирусной РНК и других репликативных функциях (например, *Tat* и *Rev* в HIV). Они фланкированы двумя последовательностями длинных концевых повторов (LTR). Цикл репликации инициируется связыванием вирусного гликопротеина с рецептором клетки-хозяина, слиянием мембран и проникновением вируса в клетку. После проникновения вирус теряет оболочку и происходит обратная транскрипция, которая приводит к образованию прединтеграционного комплекса (PIC). Другие дополнительные гены играют роль в образовании PIC и в способности лентиви-

русов инфицировать неделящиеся клетки путем активного входа в ядро через ядерную оболочку посредством PIC. После того как провирус проходит через ядерную оболочку, он самостоятельно интегрируется в геном хозяина.

Примеры лентивирусных векторов основаны на HIV-1, HIV-2, SIV или FIV. Для того чтобы получить безопасные лентивирусные векторы, создают упаковывающие клеточные линии, которые содержат несколько плазмидных векторов, например, используют векторную систему из четырех плазмид. Например, из первой плазмиды удалены вспомогательные белки (например, tat, brf, vpr и nef), так что она содержит только промотор, gag и pol и упаковывающую последовательность Psi, которая делает возможным инкорпорацию транскрибированной вирусной РНК в новый вирус, вторая плазида содержит обратную транскриптазу, третья плазида содержит ген env, замещенный на белок оболочки вируса везикулярного стоматита (VSV-G), и четвертая плазида представляет собой нужный вектор с заменой вирусных генов, необходимых для репликации, на молекулу нуклеиновой кислоты, которая должна быть доставлена.

Такие лентивирусные векторы и системы и способы получения лентивирусов известны в данной области техники (см., например, Buchshacher and Wong-Staal (2000) *Blood*, 95:2499-2504; Blomer et al. (1997) *J. Virol.*, 71:6641-9; Choi et al. (2001) *Stem Cells*, 19:236-46; патент США № 6218186). Лентивирусные векторы имеют дефекты репликации и не содержат гены, необходимые для репликации. Для получения лентивируса упаковывающую клеточную линию, обычно производные HEK 293 или другой аналогичной клеточной линии (например, клетки 293FT, номер по каталогу R700-07, Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA; клеточная линия 293LTV, номер по каталогу LTV-100, Cell Biolabs, Inc., San Diego, CA; клеточная линия Lenti-Pac 293Ta, номер по каталогу CLV-PK-01, GeneCopoeia, Rockville, MD) трансфицируют несколькими упаковывающими плазмидами. Упаковывающие плазмиды отдельно кодируют белки вириона (например, белки капсида и обратная транскриптаза) и молекулу нуклеиновой кислоты, которая должна быть доставлена с помощью вектора (которым можно трансфицировать упаковывающие клеточные линии). Одноцепочечная РНК вирусного генома транскрибируется и упаковывается в вирион. Способы получения лентивирусных векторов хорошо известны специалисту в данной области техники (см., например, Naldine et al. (1996) *Science*, 272:263-267). Лентивирусные векторы и системы для получения вируса коммерчески доступны (см., например, лентивирусные векторы экспрессии, такие как лентивирусный вектор pSMPUW и его производные, и лентивирусные экспрессирующие и упаковывающие системы от Cell Biolabs, Inc.).

Лентивирусные векторы использовали в применениях для генотерапии (см., например, Manilla et al. (2005) *Human Gene Therapy*, 16:17-25; Sheridan (2011) *Nature Biotechnology*, 29:121). В частности, лентивирусные векторы использовали для доставки короткой (малой) интерферирующей РНК (миРНК) (Sachdeva et al. (2007) *Journal of Medical Virology*, 79:118-26).

#### b. Невирусные векторы.

В качестве доставляемых агентов в способах, применениях и композициях в настоящем документе могут использоваться агенты на основе невирусных векторов. Они включают невирусные векторы экспрессии. Невирусные векторы экспрессии содержат представляющую интерес нуклеиновую кислоту, например нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид, бессмысловую ДНК или миРНК, где нуклеиновые кислоты функционально связаны с последовательностями, контролирующими экспрессию (например, промотор). Подходящие векторные основы включают, например, векторы, которые рутинно используются в данной области техники, такие как плазмиды, миникольца и искусственные хромосомы (например, искусственные хромосомы млекопитающих (MAC), бактериальные искусственные хромосомы (BAC), искусственные хромосомы дрожжей (YAC) или искусственные хромосомы растений (PAC). Многочисленные векторы и экспрессирующие системы являются коммерчески доступными от таких компаний, как Novagen (Madison, WI), Clontech (Palo Alto, CA), Stratagene (La Jolla, CA) и Invitrogen/Life Technologies (Carlsbad, CA).

Векторы, как правило, содержат одну или несколько регуляторных областей, которые являются функционально связанными с кодирующей областью. Регуляторные области включают, без ограничений, последовательности промоторов, последовательности энхансеров, SMARS (области прикрепления к ядерному матриксу), инсуляторы, элементы ответа, сайты узнавания белков, индуцибельные элементы, последовательности связывания белков, 5'- и 3'-нетранслируемые области (UTR), сайты старта транскрипции, последовательности терминации, последовательности полиаденилирования и интроны.

Промоторы, контролирующие транскрипцию в векторах в клетках-хозяевах млекопитающих, могут быть получены из различных источников, таких как геномы вирусов, таких как вирус полиомы, вирус обезьян 40 (SV40), аденовирус, ретровирусы, вирус гепатита В и наиболее предпочтительно цитомегаловирус (CMV), или из гетерологичных промоторов млекопитающих, таких как промотор  $\beta$ -актина или промотор EF1 $\alpha$ , или из гибридных или химерных промоторов (например, промотор CMV, слитый с промотором  $\beta$ -актина). Также в настоящем документе используются промоторы из клетки-хозяина или родственных видов.

Энхансер обычно относится к последовательности ДНК, которая функционирует на не фиксиро-

ванном расстоянии от сайта старта транскрипции и может находиться либо с 5'-конца, либо с 3'-конца по отношению к транскрипционной единице. Более того, энхансеры могут находиться в интроне, а также в самой кодирующей последовательности. Они обычно имеют в длину между 10 и 300 пар оснований (п.о.) и являются цис-функционирующими. Энхансеры обычно функционируют, усиливая транскрипцию с находящихся поблизости промоторов. Энхансеры также могут содержать элементы ответа, которые опосредуют регуляцию транскрипции. Хотя известно множество последовательностей энхансеров из генов млекопитающих (глобина, эластазы, альбумина, фетопротеина и инсулина), как правило, для обычной экспрессии будут использоваться энхансеры из вирусов, заражающих эукариотические клетки. Примерами являются энхансер SV40 на "поздней" стороне ориджина репликации, ранний промотор энхансер цитомегаловируса, энхансер вируса полиомы на "поздней" стороне ориджина репликации и энхансеры аденовируса.

Промотор и/или энхансер могут быть индуцибельными (например, химически или физически регулируемые). Химически регулируемый промотор и/или энхансер может, например, регулироваться присутствием спирта, тетрациклина, стероида или металла. Физически регулируемый промотор и/или энхансер может, например, регулироваться факторами окружающей среды, такими как температура и свет. Необязательно, промоторная и/или энхансерная область может действовать как конститутивный промотор и/или энхансер, чтобы максимизировать экспрессию области транскрипционной единицы, которая должна быть транскрибирована. В некоторых векторах промоторная и/или энхансерная область могут быть активны в специфичных типах клеток. Необязательно, в некоторых векторах промоторная и/или энхансерная области могут быть активны во всех эукариотических клетках, независимо от типа клетки. Примером промоторов этого типа является промотор CMV, промотор SV40, промотор  $\beta$ -актина, промотор EF1 $\alpha$  и ретровирусный длинный концевой повтор (LTR).

Векторы также могут включать, например, точки начала репликации и/или маркеры. Маркерный ген может обеспечивать для клетки селективный фенотип (например, устойчивость к антибиотику) или обнаруживаться иным образом. Примеры обнаруживаемых маркеров включают ген lacZ E. coli, зеленый флуоресцентный белок (GFP) и люциферазу. Кроме того, вектор экспрессии может включать последовательность метки, созданной для облегчения манипулирования или обнаружения (например, локализации) экспрессированного полипептида. Последовательности меток, такие как последовательности GFP, глутатион S-трансферазы (GST), полигистидина, с-тус, геммагглютинина или FLAG<sup>TM</sup> метки (Kodak; New Haven, CT), как правило, экспрессируются в виде полипептида слияния, включающего кодируемый полипептид и маркер. Такие метки могут быть введены в любое место в кодируемом полипептиде, в том числе либо на карбоксильном конце, либо на аминоконце.

В частности, желательная молекула нуклеиновой кислоты вектор экспрессии, содержащий желательную представляющую интерес молекулу нуклеиновой кислоты, например кодирующую нужный ген, бессмысловую ДНК или миРНК или другую молекулу нуклеиновой кислоты, может быть доставлена в виде оголенной ДНК и может использоваться в качестве доставляемого агента. Эффективность доставки оголенной ДНК в способах в настоящем документе можно увеличить, используя различные способы, хорошо известные специалисту в данной области техники (см., например, Li and Huang (2006) *Gene Therapy*, 13:1313-1319). Такие способы включают, например, такие подходы как электропорация, сонопорация или "генная пушка", как описано в настоящем документе и известно специалисту в данной области техники. Также эффективность доставки можно увеличить путем инкапсуляции в липосомы или за счет образования комплекса с полимерами, как описано в настоящем документе. В конкретном примере нуклеиновая кислота может доставляться в виде наночастицы.

Ссылки, иллюстрирующие применение невирусных векторов в генотерапии, включают Sheridan (2011) *Nature Biotechnology*, 29:121.

#### Наночастицы.

Невирусные доставляемые агенты включают наночастицы (обычно размером 3-200 нм), в которых молекула нуклеиновой кислоты инкапсулирована или конъюгирована с определенным носителем, который содержит молекулу направленного действия для направленной доставки в нужные клетки. Получение наночастиц для генотерапии хорошо известно в данной области техники (см., например, Cho et al. (2008) *Clin. Cancer. Res.*, 14:1310; Jin et al. (2007) *Biotechnol. Prog.*, 23:32-41). Наночастица может быть получена из полимера, например, используя полимерные носители (например, полимолочная кислота, полисахариды, поли(цианокрилаты), поли(лактид-со-гликолид)) или разветвленные полимеры для получения дендримеров, например, путем ступенчатой полимеризации из поли(L-глутаминовой кислоты) (PGA), полиамидамина (PAMAM), поли(этиленгликоля) (PEG) и полиэтиленimina (PEI). Можно использовать биodeградируемые полимеры, которые включают, например, полимолочную кислоту, полигликолиевую кислоту, полимолочную-гликолиевую кислоту (PLGA) или поли(метилметакрилат) (PMMA). Другие типы наночастиц могут быть получены в виде липосом с использованием различных смесей липидов; в виде магнитных наночастиц с использованием оксида железа, в виде кремниевых наночастиц с использованием SiO<sub>2</sub> или в виде золотых наночастиц с использованием золотохлористоводородной кислоты или цитрата натрия. Системы наночастиц хорошо известны специалисту в данной об-

ласти техники.

Наночастицы можно функционализировать путем конъюгации молекулы направленного действия с поверхностью наночастицы или покрытия ею поверхности наночастицы, например молекула направленного действия представляет собой лиганд для рецепторов, экспрессируемых в клетках-мишенях, или иным образом связывается с ними. Такие молекулы направленного действия включают, но не ограничиваются ими, лиганды, антитела или пептиды. В конкретных примерах для увеличения селективности по отношению к клетке можно использовать подход с двумя лигандами. Примерами молекул направленного действия могут быть фактор роста, например фактор роста фибробластов, который специфично взаимодействует с рецептором фактора роста фибробластов. Выбор молекулы направленного действия зависит от конкретного применения, в том числе целевой ткани или органа, и специалист в данной области техники может определить это опытным путем. Наночастицы направленного действия хорошо известны в данной области техники (см., например, Franzen (2011) *Expert Opin. Drug. Deliv.* 8(3):281-98; Faraji and Wipf (2009) *Bioorg. Med. Chem.* 17(8):2950-62; Sajja et al., (2009) *Curr. Drug. Discov. Technol.* 6(1):43-51). В частности, способы для тканеспецифичной доставки наночастиц хорошо известны в данной области техники (см., например, Haggis et al. (2010) *Biomaterials*, 31:998-1006). Например, паренхимные гепатоциты экспрессируют асиалогликопротеиновый рецептор (ASGP-R) и лектины печени. Таким образом, специфичные для печени наночастицы известны в данной области техники и могут быть функционализированы агентами, которые узнают асиалогликопротеиновый рецептор (ASGP-R) и другие рецепторы, в том числе, например, асиало-фетуином, асиало-трансферрином, асиало-церулоплазмином, асиало-лактоферрином, асиало-орозомукоидом, Iac-BSA, гепатоглобулином, антителами и галактозой (см., например, Pathak et al. (2008) *Int. J. Nanomedicine*, 3:31-49).

#### с. Целые клетки.

Способы в настоящем документе можно использовать для доставки клеток, содержащих доставляемые *ex vivo* нуклеиновые кислоты, в качестве доставляемого агента. Например, клетки, выделенные из пациента или донора, в которые введена экзогенная гетерологичная нуклеиновая кислота, могут быть доставлены непосредственно пациенту способами по настоящему документу. Преимущество настоящего способа заключается в том, что иммунный ответ на клетки снижен за счет сосудистой компартментализации. Таким образом, в настоящем документе предусмотрен способ введения генетически модифицированной клетки или клеток в компартментализованный орган или его часть в субъекте. Способ включает компартментализацию органа или его части, введение генетически модифицированной клетки или клеток в компартментализованный орган или его часть, поддержание компартментализации на протяжении периода времени после введения генетически модифицированной клетки или клеток, как описано в настоящем документе; и восстановление кровообращения через сосуды с органом или его частью. Количество клеток, которое вводится, зависит от нужного эффекта, конкретной нуклеиновой кислоты, субъекта, подвергаемого лечению, и других аналогичных факторов, и может быть определено специалистом в данной области техники.

Клетки, в которые может быть введена нуклеиновая кислота для целей генотерапии, включают любые желательные доступные типы клеток и включают, но не ограничиваются ими, эпителиальные клетки, эндотелиальные клетки, кератиноциты, фибробласты, мышечные клетки, гепатоциты; клетки крови, такие как Т-лимфоциты, В-лимфоциты, моноциты, макрофаги, нейтрофилы, эозинофилы, мегакариоциты, гранулоциты; различные стволовые клетки или клетки-предшественники, в частности гематопоетические стволовые клетки или клетки-предшественники, например, полученные из костного мозга, пуповинной крови, периферической крови или фетальной печени. Например, генетически модифицированные клетки могут быть плюрипотентными или тотипотентными стволовыми клетками (в том числе индуцированными плюрипотентными стволовыми клетками), или могут быть эмбриональными, фетальными или полностью дифференцированными клетками. Генетически модифицированные клетки могут быть клетками того же самого субъекта, или могут быть клетками того же самого или другого вида, что и субъект-реципиент. В предпочтительном примере, клетка, используемая для генотерапии, является аутологичной для пациента. Способы генетической модификации клеток и трансплантации клеток известны в данной области техники.

Как правило, нуклеиновую кислоту вводят в клетку перед введением полученной рекомбинантной клетки *in vivo*. Такое введение можно осуществить любым способом, известным в данной области техники, включая, но не ограничиваясь этим, путем трансфекции, электропорации, микроинъекции, инфицирования вирусным вектором или вектором на основе бактериофага, содержащим последовательности нуклеиновой кислоты, слияния клеток, хромосомного переноса генов, опосредованного микроклетками переноса генов, слияния сферопластов и т.п. В данной области техники известно множество методов для введения чужеродных генов в клетки (см., например, Loeffler and Behr, *Meth. Enzymol.* (1993) 217:599-618; Cotten et al., *Meth. Enzymol.* (1993) 217:618-644; Cline, *Pharmac. Ther.* (1985) 29:69-92), которые могут быть использованы, при условии, что при этом не нарушаются необходимые связанные с развитием и физиологические функции клеток-реципиентов. В конкретных примерах способ представляет собой такой способ, который обеспечивает стабильный перенос нуклеиновой кислоты в клетку, так что нуклеиновая кислота экспрессируется клеткой и наследуется и экспрессируется в клетках-потомках.

### 3. Примеры агентов для генотерапии.

Доставляемый агент, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, для применения в способах, применениях или композициях в настоящем документе может представлять собой любой вирусный или невирусный вектор, кодирующий представляющую интерес нуклеиновую кислоту, такую как любой агент для генотерапии, известный специалисту в данной области техники. Выбор соответствующего агента для генотерапии в зависимости от конкретного заболевания или состояния, которое подвергается лечению, находится в пределах компетентности специалиста в данной области техники. Сотни агентов для генотерапии находятся в клинических исследованиях, и несколько из них получили одобрение для продажи в Европе (например, Glybera®, AdLPL) и Китае (например, rAd53, Gendicine®) (см., например, Sheridan (2011) *Nature Biotechnology*, 29:121).

Например, примеры векторов для генотерапии включают терапевтические агенты на основе аденовирусов или AAV. Неограничивающие примеры терапевтических агентов на основе аденовирусов или AAV для применения в способах, применениях или композициях в настоящем документе включают, но не ограничиваются ими, rAd-p53, который представляет собой рекомбинантный аденовирусный вектор, кодирующий человеческий супрессор опухоли белок p53 дикого типа, например, для применения в лечении рака (также известный как Gendicine®, Genkaxin®, Qi et al. (2006) *Modern Oncology*, 14:1295-1297); Ad5\_d11520, представляющий собой аденовирус, у которого отсутствует ген E1B, для инактивации p53 хозяина (также известный, как H101 или ONYX-015; см., например, Russell et al. (2012) *Nature Biotechnology*, 30:658-670); AD5-D24-GM-CSF, аденовирус, содержащий цитокин GM-CSF, например, для применения в лечении рака (Cerullo et al. (2010) *Cancer Res.*, 70:4297); rAd-HSVtk, аденовирус, дефектный по репликации, с геном тимидинкиназы HSV, например, для лечения рака (разработанный как Cerepro®, Ark Therapeutics, см., например, патент США № 6579855; разработанный как ProstAtak™ компанией Advantagene; международная заявка PCT № WO2005/049094); rAd-TNF $\alpha$ , аденовирусный вектор, дефектный по репликации, экспрессирующий человеческий фактор некроза опухоли альфа (TNF- $\alpha$ ) под контролем промотора EGR-1, индуцируемого химиорадиацией, например, для лечения рака (TNFerade™, GenVec; Rasmussen et al. (2002) *Cancer Gene Ther.*, 9:951-7); rAd-FGF4, аденовирусный вектор серотипа 5, кодирующий FGF-4, например, для лечения ангиогенеза и заболевания коронарных артерий (GENERX, BioDrugs, 2002, 16:75-6; патент США № 5792453); rAd-VEGF-D, аденовирусный вектор 5, содержащий ген, кодирующий фактор роста эндотелия сосудов (VEGF-D), например, для применения в лечении заболеваний и состояний, связанных с ангиогенезом (Trinam®, Ark Therapeutics; опубликованная заявка США № US20120308522); rAd-PDGF, аденовирусный вектор 5, содержащий ген, кодирующий PDGF-B, например, для лечения ран (Excellerate, GAM501 Tissue Repair Co.; Blume et al. (2011) *Wound Repair Regen.*, 19:302-308); Ad-IFN $\beta$ , вектор на основе аденовируса серотипа 5, у которого удалены гены E1 и E3, экспрессирующий ген интерферона-бета человека под контролем немедленно-раннего промотора цитомегаловируса (CMV), например, для лечения рака (BG00001 и H5.110CMVhIFN-beta, Biogen; Sterman et al. (2010) *Mol. Ther.*, 18:852-860); AAV, содержащий ген, кодирующий ген дефицита липопротеинлипазы (LPLD), например, для лечения субъектов с LPLD или семейной гиперхиломикронемией (alipogene tiparvovet, Glybera®, Amsterdam Molecular Therapeutics; см., например, международную опубликованную заявку № WO2010/134806; WO2001000220, Yla-Herttuala (2012) *Mol. Ther.*, 20:1831-2); AMT-021, AAV, содержащий ген, кодирующий фермент порфириногендезаминазу (PBGD), например, для лечения субъектов с острой интермиттирующей порфирией (AIP) (см., например, опубликованную заявку США № US2011/0262399; европейский патент № EP1049487); rAAV9-CMV-hNaGlu, AAV-9, содержащий ген, кодирующий NaGlu под контролем промотора CMV (см., например, Fu et al. (2011) *Mol. Ther.*, 19:1025-33).

Другие примеры агентов для генотерапии для применения в способах, применениях и композициях в настоящем документе включают, но не ограничиваются ими, rAd-H1F1 $\alpha$  (Genzyme/Sunway), V930/V932 (Merck), NLX-P101 (Neurologix), Toca-511 (Tocagen, San Diego), LentiGlobin (Bluebird Bio), ProSavin (Oxford BioMedica), rAAV-1-CB-hAAT (Applied Genetic Technologies), rAAV2-CB-специфичный для ретикулярного пигментного эпителия человека белок массой 65 Да (RPE65) (Applied Genetic Technologies), AMT-101 (Amsterdam Molecular), Ad5CMV-p53 (Aventis), CERE-120 (Ceregene, San Diego), CERE-110 (Ceregene, San Diego), SERCA-2a (Celladon, La Jolla), AAV2-sFLT01 (Genzyme), tgAAG76 (Targeted Genetics, Seattle), tgAAC94 (Targeted Genetics, Seattle), GX-12 (Genexine, Seoul, Korea), SC1B1 (ScanCell, Nottingham, UK), Allovectin-7 (Vical, San Diego), VM202 (ViroMed, Mirmetonka, MN) или наночастица Rixin-G (Ereius Biotechnologies, San Marino, CA).

#### Е. Композиции, системы и наборы.

Предусмотрены композиции, содержащие доставляемые агенты, для применения для доставки в ткань, или орган, или их части с помощью компартиментализованного способа (способа с разделением) по настоящему документу. Предусмотренные в настоящем документе композиции подходят для введения *in vivo*. Композиции составлены для введения в паренхиму. Как правило, в настоящем документе предусмотрены инъекционные композиции. Инъекционные композиции могут быть получены в традиционной форме, либо в виде жидких растворов, либо в виде суспензий, в твердых формах, подходящих для рас-

творения или суспендирования в жидкости перед инъекцией, или в виде эмульсий. Обычно предусмотренные в настоящем документе композиции доставляемого агента находятся в жидкой форме.

Композиции могут содержать фармацевтически приемлемый носитель. Для инъекций носитель будет, как правило, представлять собой жидкость. В частности, фармацевтический носитель представляет собой любой носитель, который не является неподходящим с биологической или иной точки зрения, т.е., субъекту вводят такие композиции, которые не вызывают нежелательных побочных эффектов или в которых носитель не взаимодействует неблагоприятным образом с другими компонентами фармацевтической композиции, в которой он содержится. Носитель выбирают таким образом, чтобы минимизировать деградацию активного ингредиента и чтобы минимизировать нежелательные побочные эффекты для субъекта. Например, фармацевтически приемлемые носители для введения в клетки, как правило, представляют собой носитель, приемлемый для доставки путем инъекции, и не включают агенты, такие как детергенты или другие соединения, которые могут повреждать клетки.

Подходящие носители и их композиции описаны в Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21<sup>st</sup> Edition, David B. Troy, ed., Lippicott Williams & Wilkins (2005). Композиции для введения включают стерильные водные или неводные растворы, суспензии и эмульсии. Примерами неводных растворителей являются пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, растительные масла, такие как оливковое масло, и инъекционные органические эфиры, такие как этилолеат. Водные носители включают воду, спиртовые/водные растворы, эмульсии или суспензии, в том числе солевые и буферные среды. В качестве инъекционной среды, в общем, носители включают воду, которая содержит добавки, используемые для инъекционных растворов, такие как стабилизирующие агенты, соли или солевые растворы и/или буферы. Примеры физиологически приемлемых носителей включают стерильные водные, солевые, буферные растворы или растворы декстрозы. Например, примеры физиологических носителей включают физиологический солевой раствор, фосфатный буферный солевой раствор, сбалансированный солевой раствор (BSS) или раствор Рингера, и растворы, содержащие загустители и солубилизирующие агенты, такие как глюкоза, полиэтиленгликоль и полипропиленгликоль, и их смеси. pH раствора обычно составляет от примерно 5 до примерно 8 или примерно от 7 до 7,5. При необходимости, pH композиции можно регулировать с помощью фармацевтически приемлемых кислот, оснований или буферов для повышения стабильности соединения в композиции или его формы для доставки.

Доставляемый агент (который представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты или содержит молекулу нуклеиновой кислоты) может быть составлен в виде композиции в качестве единственного фармацевтически активного ингредиента или может быть в комбинации с другими активными агентами для конкретного расстройства, подвергаемого лечению. Необязательно, в предусмотренные в настоящем документе композиции могут быть включены другие лекарственные агенты, фармацевтические агенты, носители, адъюванты, разбавители. Например, в композициях также могут присутствовать любой один или несколько смачивающих агентов, эмульгаторов и смазывающих агентов, таких как лаурилсульфат натрия и стеарат магния, а также красителей, регуляторов высвобождения, агентов для покрытия оболочки, подсластителей, вкусовых и ароматизирующих агентов, консервантов, антиоксидантов, хелатирующих агентов и инертных газов. Примеры других агентов и эксципиентов, которые могут быть включены в композиции, включают, например, водорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, гидрохлорид цистеина, бисульфат натрия, метабисульфат натрия, сульфит натрия; маслорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбилпальмитат, бутилированный гидроксианизол (ВНА), бутилированный гидрокситолуол (ВНТ), лецитин, пропиленгаллат,  $\alpha$ -токоферол; и хелатирующие металлы агенты, такие как лимонная кислота, этилендиамин тетрауксусная кислота (EDTA), сорбитол, винная кислота и фосфорная кислота.

Композиции также могут быть составлены в виде препаратов с замедленным высвобождением, таких как препараты, адсорбированные на биodeградируемых подложках, включая коллагеновые губки, или в виде липосом. Композиции с замедленным высвобождением могут быть составлены для многократного введения, так что на протяжении выбранного периода времени, такого как месяц или примерно год, вводят несколько доз. Таким образом, например, липосомы могут быть получены таким образом, чтобы отдельные дозы вводить одной инъекцией в общем количестве от примерно двух до примерно пяти или более раз.

Композиции могут быть получены с носителями, которые защищают их от быстрого выведения из организма, такими как носители для композиций с замедленным высвобождением или оболочки. Такие носители включают носители для композиций с контролируемым высвобождением, такие как, например, микроинкапсулированные системы доставки и биodeградируемые, биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолиевая кислота, полиортоэфиры, полимолочная кислота и другие типы имплантантов, которые могут быть помещены непосредственно в тело. Композиции также можно вводить в пеллетах, таких как пеллеты ELVAX (смола сополимера этилена и винилацетата).

Липосомные суспензии, в том числе адресно направляемые в ткани липосомы, также могут быть пригодны в качестве фармацевтически приемлемых носителей. Например, липосомные композиции могут быть получены способами, известными специалистам в данной области техники (см., например, Kim et al. (1983) *Bioch. Bioph. Acta* 728:339-348; Assil et al. (1987) *Arch Ophthalmol.* 105:400 и патент США №

4522811). Доставляемый агент может быть инкапсулирован в водную фазу липосомных систем.

Активные материалы также могут быть смешаны с другими активными материалами, которые не ослабляют нужное свойство, или с материалами, которые дополняют нужное свойство или имеют другие свойства, в том числе с вязкоупругими материалами, такими как гиалуроновая кислота, которая продается под торговой маркой HEALON, которая представляет собой раствор высокомолекулярной (MW), примерно 3 млн Да, фракции гиалуроната натрия (произведено Pharmacia, Inc; см., например, патенты США №№ 5292362, 5282851, 5273056, 5229127, 4517295 и 4328803). Могут быть включены дополнительные активные агенты.

#### 1. Дозированные композиции.

В настоящем документе предусмотрены композиции, содержащие доставляемый агент, составленный в виде композиции для введения в паренхиму ткани или органа в количестве, которое в 100 или более раз меньше, чем количество того же самого доставляемого агента, вводимого внутривенно. Например, предусмотрены композиции, содержащие доставляемый агент, составленный в виде композиции для введения в паренхиму ткани или органа, в количестве, которое более чем в 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 5000, 10000 раз меньше или еще меньше, чем количество того же самого доставляемого агента, вводимого внутривенно в целевой орган или ткань. Композиции могут быть предусмотрены в виде композиций для однократного введения или для многократного введения.

Например, предусмотрены композиции, содержащие некоторое количество доставляемого агента, который представляет собой аденовирус или аденоассоциированный вирус. В частности, аденовирус или аденоассоциированный вирус представляет собой такой вирус, который содержит в своем геноме по меньшей мере одну гетерологичную молекулу нуклеиновой кислоты, такую как молекула терапевтической нуклеиновой кислоты. Количество аденовируса в композиции для однократного введения составляет от 10 БОЕ до  $1 \times 10^{12}$  БОЕ, от  $1 \times 10^2$  БОЕ до  $1 \times 10^{10}$ , от  $1 \times 10^3$  БОЕ до  $1 \times 10^{10}$  БОЕ, от  $1 \times 10^3$  БОЕ до  $1 \times 10^9$  БОЕ, от  $1 \times 10^3$  БОЕ до  $1 \times 10^8$  БОЕ или от  $1 \times 10^6$  БОЕ до  $1 \times 10^9$  БОЕ, или составляет от 10 частиц до  $1 \times 10^{12}$  частиц, от  $1 \times 10^2$  частиц до  $1 \times 10^{10}$  частиц, от  $1 \times 10^3$  частиц до  $1 \times 10^{10}$  частиц, от  $1 \times 10^3$  частиц до  $1 \times 10^9$  частиц, от  $1 \times 10^3$  частиц до  $1 \times 10^8$  частиц или от  $1 \times 10^6$  частиц до  $1 \times 10^9$  частиц. Обычно количество аденовируса в композиции для однократного введения составляет от 10 вр до  $1 \times 10^{12}$  вр, от  $1 \times 10^2$  вр до  $1 \times 10^{10}$  вр, от  $1 \times 10^3$  вр до  $1 \times 10^{12}$  вр, от  $1 \times 10^3$  вр до  $1 \times 10^{10}$  вр, от  $1 \times 10^3$  вр до  $1 \times 10^9$  вр, от  $1 \times 10^3$  вр до  $1 \times 10^8$  вр, от  $1 \times 10^3$  вр до  $1 \times 10^6$  вр, от  $1 \times 10^6$  вр до  $1 \times 10^{12}$  вр, от  $1 \times 10^6$  вр до  $1 \times 10^{10}$  вр или составляет менее, или примерно менее  $1 \times 10^{12}$  вр,  $1 \times 10^{11}$  вр,  $1 \times 10^{10}$  вр,  $1 \times 10^9$  вр,  $1 \times 10^8$  вр,  $1 \times 10^7$  вр,  $1 \times 10^6$  вр,  $1 \times 10^5$  вр,  $1 \times 10^4$  вр,  $1 \times 10^3$  вр,  $1 \times 10^2$  вр, 10 вр или меньше. В других примерах количество аденовируса в композиции для однократного введения составляет от 10 БОЕ до  $1 \times 10^{12}$  БОЕ, от  $1 \times 10^2$  БОЕ до  $1 \times 10^{10}$  БОЕ, от  $1 \times 10^3$  БОЕ до  $1 \times 10^{12}$  БОЕ, от  $1 \times 10^3$  БОЕ до  $1 \times 10^{10}$  БОЕ, от  $1 \times 10^3$  БОЕ до  $1 \times 10^9$  БОЕ, от  $1 \times 10^3$  БОЕ до  $1 \times 10^8$  БОЕ, от  $1 \times 10^3$  БОЕ до  $1 \times 10^6$  БОЕ, от  $1 \times 10^6$  БОЕ до  $1 \times 10^{12}$  БОЕ, от  $1 \times 10^6$  БОЕ до  $1 \times 10^{10}$  БОЕ, или составляет менее, или примерно менее  $1 \times 10^{12}$  БОЕ,  $1 \times 10^{11}$  БОЕ,  $1 \times 10^{10}$  БОЕ,  $1 \times 10^9$  БОЕ,  $1 \times 10^8$  БОЕ,  $1 \times 10^7$  БОЕ,  $1 \times 10^6$  БОЕ,  $1 \times 10^5$  БОЕ,  $1 \times 10^4$  БОЕ,  $1 \times 10^3$  БОЕ,  $1 \times 10^2$  БОЕ, 10 БОЕ, или меньше. Композиции могут быть составлены в объеме от 10 мкл до 5 мл, например от 20 мкл до 1 мл или от 50 до 500 мкл. В таких композициях аденовирус составлен в виде композиции для введения в паренхиму. В конкретных примерах аденовирус составлен в виде композиции для введения в паренхиму печени.

#### 2. Комбинации.

Композиции, содержащие доставляемый агент, составленные для введения в паренхиму, могут быть предусмотрены в комбинации с другими агентами. Другие агенты могут представлять собой агенты, увеличивающие эффективность или облегчающие проникновение доставляемого агента в паренхимные клетки, или регулирующие или модулирующие иммунный ответ на доставляемый агент.

Например, в настоящем документе предусмотрены комбинации, содержащие композиции, содержащие доставляемый агент, составленные для введения в паренхиму, и агент или носитель для доставки, который связывается или образует комплекс с доставляемым агентом и опосредует его проникновение в клетки. Примеры агентов включают, но не ограничиваются ими, катионные липосомы и липиды, липопротеины, синтетические полимеры или полипептиды, минеральные соединения или витамины. Примеры полимеров включают поликатионы или полианионы. Например, доставляемый агент может быть предусмотрен в виде комбинации с полиамином, преципитатом фосфата кальция, гистоновым белком, протамином, полиэтиленамином, полилизином, полиаргинином, полиорнитином DEAE декстраном, полибренном, комплексом полиамфолитов, спермином, спермидином, путресцином, сывороточным альбумином человека, ДНК-связывающими белками, негистоновыми хромосомными белками, белками оболочки из ДНК вирусов и полимерами N-замещенных глицинов. Агенты могут быть составлены в виде отдельных композиций или в виде совместной композиции.

В следующем примере экспрессию терапевтического трансгена можно усилить с помощью транскрипционных энхансеров, таких как ингибиторы гистондеацетилаз (HDAC), например гидроксамовая кислота, циклический тетрапептид, вальпроевая кислота и другие. Таким образом, доставляемый агент может быть предусмотрен в комбинации с агентом или соединением, которые представляют собой транскрипционный энхансер вирус-специфического рецептора клеточной поверхности. Такие агенты или

соединения включают, например, ингибиторы гистондеацетилазы (HDAC). Ингибиторы HDAC включают соединения, которые относятся к классу соединений гидроксамовых кислот, циклических тетрапептидов, бензамидов, электрофильных кетонов или алифатических кислот. Например, ингибиторы HDAC включают, но не ограничиваются ими, трихостатин А, вориностат (SAHA), белиностат (PXD101), LAQ824, панобиностат (LBH589), энтиностат (MS-275), C199, моцетиностат (MGCD0103), ромидепсин (истодакс), вальпроевую кислоту, PCI-24781, SB939, ресминостат, гивиностат, CUDC-101, AR-42, CHR-2845, CHR-3996, 4SC-202, CG200745, кветрин или трихостатин А (TSA). Примером ингибитора HDAC является вальпроевая кислота, которая представляет собой транскрипционный энхансер рецептора CAR аденовируса. Исследования показали, что в присутствии вальпроевой кислоты увеличивается поглощение аденовирусов (Segura-Pancheco et al. (2007) *Genet. Vaccines Ther.*, 5:10). В таких примерах композиции, содержащие доставляемый агент, составлены в виде совместной композиции с дополнительным агентом или соединением (например, агентом, который является транскрипционным энхансером) или в виде отдельных композиций. Агент транскрипционный энхансер может быть предусмотрен в количестве между или примерно между 50 и 8000 мг, например между или примерно между 100 и 5000 мг, 1000 и 4000 мг. Композиция агента или соединения в комбинации может быть составлена для однократного введения или для многократного введения. Композиция дополнительного агента или соединения может быть составлена для любого способа введения, который является приемлемым и известен специалисту в данной области техники. Например, транскрипционный энхансер может быть составлен в виде композиции для перорального введения, внутривенного введения, подкожного введения или для введения в паренхиму.

В следующем примере в настоящем документе предусмотрены комбинации, содержащие композиции, содержащие доставляемый агент, составленные для введения в паренхиму, и композиции, содержащие иммуносупрессивный агент. Примеры иммуносупрессивных агентов включают, но не ограничиваются ими, циклоспорин (neoral®, Sandimmune®), преднизон (Novo Prednisone®, Apo Prednisone®), азатиоприн (Imuran®), такролимус или FK506 (Prograf®), мофетила микофенолят (CellCept®), сиролимус (Rapamune®), OKT3 (Muromonab CO3®, Orthoclone®), ATGAM и антитимоцитарный глобулин. В таких примерах композиции, содержащие доставляемый агент, составлены в виде совместной композиции с иммуносупрессивным агентом или в виде отдельных композиций. Дополнительные композиции, содержащие иммуносупрессивный агент, могут быть составлены для любого способа введения, который является приемлемым и известен специалисту в данной области техники. Например, иммуносупрессивный агент может быть составлен для перорального введения, внутривенного введения, подкожного введения или для введения в паренхиму.

### 3. Изделия и наборы.

Композиции или комбинации могут быть упакованы для хранения и/или применения. Упаковочные материалы для применения в упаковке агентов хорошо известны специалистам в данной области техники. Примеры упаковочных материалов включают ампулы, бутылки, пробирки, флаконы, контейнеры, шприцы и любые упаковочные материалы, подходящие для выбранной композиции и введения в паренхиму. Например, композиции или комбинации могут быть помещены в ампулы, одноразовые шприцы или многодозовые или однодозовые флаконы, сделанные из стекла, пластика или другого подходящего материала. Упаковочный материал может включать иглу или другое устройство для инъекций, чтобы облегчать введение в паренхиму. Выбор упаковки зависит от конкретного доставляемого агента. В общем, упаковочный материал не реагирует с композициями, содержащимися внутри него. Также композиции и упаковочный материал являются стерильными.

Например, композиция, содержащая доставляемый агент, может быть предусмотрена в контейнере, таком как запечатанный стерильный флакон или шприц, содержащий такое количество композиции, что при введении доставляется эффективное количество доставляемого агента (например, вирусных частиц). Количество доставляемого агента, такого как аденовирус или аденоассоциированный вирус, в композиции находится в диапазоне между или примерно между  $10$  БОЕ и  $1 \times 10^{12}$  БОЕ,  $1 \times 10^2$  БОЕ и  $1 \times 10^{10}$ ,  $1 \times 10^3$  БОЕ и  $1 \times 10^{10}$  БОЕ,  $1 \times 10^3$  БОЕ и  $1 \times 10^9$  БОЕ,  $1 \times 10^3$  БОЕ и  $1 \times 10^8$  БОЕ или  $1 \times 10^6$  БОЕ и  $1 \times 10^9$  БОЕ; или между или примерно между  $10$  частицами и  $1 \times 10^{12}$  частицами,  $1 \times 10^2$  частицами и  $1 \times 10^{10}$  частицами,  $1 \times 10^3$  частицами и  $1 \times 10^{10}$  частицами,  $1 \times 10^3$  частицами и  $1 \times 10^9$  частицами,  $1 \times 10^3$  частицами и  $1 \times 10^8$  частицами или  $1 \times 10^6$  частицами и  $1 \times 10^9$  частицами. Объем композиции в контейнере может составлять от 50 мкл до 50 мл, от 50 мкл до 5 мл, от 50 до 500 мкл, от 100 мкл до 10 мл, от 100 мкл до 5 мл, от 100 мкл до 2 мл, от 100 мкл до 1 мл, от 200 мкл до 4 мл, от 200 мкл до 2 мл, от 1 до 10 мл или от 1 до 2 мл. Например, контейнер может быть предусмотрен для одноразового или для многократного введения. Объем агента в контейнере может составлять от 100 мкл до 10 мл, где доставляется примерно от 20 до 5 мл, например от 20 до 500 мкл, от 50 до 150 мкл, от 100 мкл до 10 мл или от 200 мкл до 2 мл агента, содержащего по меньшей мере примерно от  $10$  до  $10^{10}$  бляшкообразующих единиц (БОЕ) или частиц, например от  $10^2$  до  $10^6$  бляшкообразующих единиц (БОЕ) или частиц в таком объеме.

Композиции или комбинации, содержащие доставляемый агент, могут быть упакованы в виде изделий, содержащих упаковочный материал, количество агента, составленного в виде композиции для введения в паренхиму для однократного введения или многократного введения, и этикетку, в которой ука-

зано, что доставляемый агент предназначен для применения для доставки конкретной молекулы нуклеиновой кислоты и/или для конкретного применения.

Такие заключенные в упаковку композиции, комбинации и изделия могут быть предусмотрены в виде наборов. В частности, предусмотрены наборы, содержащие ампулы, бутылки, пробирки, флаконы, контейнеры, шприцы с заключенной в них композицией доставляемого агента. Наборы могут необязательно поставляться с устройством, которое обеспечивает введение доставляемого агента, таким как шприц, игла или другое устройство для инъекций. Композиции могут содержаться в элементе для введения или могут быть предусмотрены отдельно для добавления в него позднее. Набор может, необязательно, включать инструкции по применению, включающие в том числе дозы, режим дозирования и инструкции по введению. Также предусмотрены другие реагенты. Например, наборы могут необязательно включать устройство, с помощью которого осуществляют компартиментализацию ткани или органа, или его части, инструменты для осуществления мобилизации ткани или органа, таймер, чтобы контролировать компартиментализацию, и другие реагенты для применения в практике способа. Например, набор может включать зажим на паренхиме.

Г. Оценка доставки, экспрессии или эффективности.

При осуществлении компартиментализованного способа по настоящему документу с целью подтверждения доставки доставляемого агента, экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты и/или для того, чтобы иным образом валидировать практику способа, можно контролировать или оценивать любое число параметров. Например, можно контролировать проникновение доставляемого агента в клетки, можно оценивать присутствие доставляемого агента в паренхиме или в общей системе кровообращения, можно контролировать или оценить экспрессию кодируемого полипептида, можно оценивать токсичность для ткани и/или можно определять активацию иммунной системы. Специалисту в данной области техники известны такие способы и методы. Такие способы и методы могут осуществляться по желанию.

1. Мониторинг доставляемого агента.

Например, при доставке или введении доставляемого агента с использованием способа по настоящему документу можно оценить или обнаружить присутствие доставляемого агента в субъекте. Например, можно осуществить приведенные в настоящем документе в качестве примера анализы для измерения системного высвобождения доставляемого агента или экспрессированного продукта трансгена в периферическую кровь перед, в процессе и после снятия сосудистой изоляции. Как правило, в способах в настоящем документе после непосредственного введения доставляемого агента в ткань или орган, или его часть, используя способы по настоящему документу, в общей системе кровообращения обнаруживается меньше чем 10% и обычно меньше чем 5, 4, 3, 2 или 1% продукта трансгена.

Обнаружение доставляемого агента можно облегчить путем конъюгации или функционального связывания доставляемого агента или молекулы нуклеиновой кислоты с обнаруживаемым фрагментом. Обнаруживаемые фрагменты хорошо известны специалисту в данной области техники, и включают, но не ограничиваются ими, хемилюминесцентные фрагменты, биолюминесцентные фрагменты, флуоресцентные фрагменты, радионуклиды и металлы. Например, обнаруживаемые фрагменты включают, например, люциферазу, зеленый флуоресцентный белок, красный флуоресцентный белок, коллоидное золото, железо, гадолиний и галлий-67, и другие фрагменты, хорошо известные специалисту в данной области техники.

Доставляемый агент можно отслеживать в ткани или в образце биологической жидкости. Например, паренхимную ткань и, в частности, ее компартиментализованную область можно собрать и обработать (например, путем гомогенизации) и выделить или очистить из нее РНК или ДНК. Биологические жидкости, которые можно оценивать, включают, например, периферическую кровь. Способы экстракции РНК и ДНК из ткани или биологических жидкостей хорошо известны специалисту в данной области техники. Например, как правило, для экстрагирования РНК из биологического материала используются способы на основе реагента TRIzol® (например, реагент TRIzol®, Life Technologies, Carlsbad, CA). Например, могут быть сконструированы ген-специфичные праймеры или зонды, и доставляемый агент или молекулу нуклеиновой кислоты можно обнаружить, используя ПЦР и другие стандартные способы, известные специалисту в данной области техники. В качестве примера в настоящем документе в разделе "Примеры ПЦР" осуществляли, используя праймеры против люциферазы.

Обнаружение в ткани (например, гомогенизированный образец ткани) или в образце биологической жидкости также можно осуществить, используя флуориметр, люминометр, колориметрический сканер для планшетов, счетчик Гейгера, жидкостный сцинтилляционный счетчик. Выбор способа зависит от конкретного обнаруживаемого фрагмента и находится в пределах компетентности специалиста в данной области техники. Например, активность люциферазы можно оценить, используя люминометр, как приведено в качестве примера в "Примерах". Более того, обнаружение необязательно проводят путем обнаружения в биологическом образце от субъекта экспрессии полипептида, кодируемого доставляемым агентом. Полипептид можно обнаружить, используя методики, известные специалисту в данной области техники, включая, но не ограничиваясь ими, вестерн-блоттинг, иммуногистохимию, иммунофлуоресценцию или ELISA.

В конкретных примерах из ткани или органа также могут быть выделены паренхимные клетки, и

внутри клеток может быть оценено присутствие доставляемого агента. В частности, выделение паренхимных клеток, как правило, осуществляют путем ферментативного расщепления ткани с использованием трипсина, коллагеназы и/или другой протеазы. Такие методики хорошо известны специалисту в данной области техники (см., например, Somers et al. (2007) DMD, 35:1797-1805; *Methods in Cell Biology*, vol XIII, David M. Prescott ed., Academic Press, 1976; Chapter 4, "Preparation of Isolated Rat Liver Cells", p. 29-83). Например, ткань можно обработать путем перфузии, например, фосфатным буферным солевым раствором, для удаления крови. Ткань можно измельчить ножницами и расщепить в среде для расщепления, содержащей протеазу. Это, как правило, приводит к получению суспензии клеток, которую можно профильтровать, чтобы собрать клетки. Любые остаточные протеазы можно инактивировать, например, собирая клетки в фетальную бычью сыворотку. Клетки далее можно промыть и культивировать в выбранной среде для культивирования клеток, которая, как известно, совместима с конкретными клетками. Можно оценить жизнеспособность клеток, и в свежевыделенных клетках можно проанализировать внутриклеточное присутствие доставляемых агентов. Присутствие внутриклеточных агентов можно оценить путем фиксации и пермеабилзации мембран клеток (например, используя коммерчески доступные реагенты, такие как, ORTHOPermeaFix™ (OPF) или FIX&PERM Cell Permeabilization kit®; An Der Grub Bio Research GmbH, Imtec). Клетки можно анализировать с помощью проточной цитометрии, используя сканер для планшетов (например, флуориметр, люминометр или колориметрический сканер для планшетов), или путем оценки радиоактивности. Кроме того, при желании, можно использовать способы микроскопии. Кроме того, могут быть получены гомогенаты клеток, которые можно использовать для вестерн-блоттинга.

## 2. Токсичность для хозяина и иммунная активация.

Также можно оценить токсичность для ткани и иммунный ответ, инициируемый при введении доставляемого агента. Например, токсичность можно оценить с помощью гистопатологии подлежащей ткани или органа, или его части. Образцы ткани можно получить путем биопсии и окрасить для гистологического анализа, как правило, используя гематоксилин и эозин. Можно оценить клеточные нарушения. Например, с помощью гистопатологического анализа можно идентифицировать воспалительные клеточные инфильтраты, такие как инфильтраты лимфоцитов или нейтрофилов, ассоциированные с иммунной активацией. Сравнение можно проводить с областью той же ткани или органа того же субъекта, которая не была подвергнута компарментализации. В других примерах можно использовать ткани контрольных субъектов, которых не подвергали лечению способом по настоящему документу.

Токсичность также можно отслеживать, оценивая экспрессию факторов или маркеров, уровень которых повышается при повреждении ткани или органа или которые присутствуют или ассоциированы с повреждением ткани или органа. Например, можно оценить биохимические маркеры повреждения ткани. Такие маркеры известны специалисту в данной области техники и будут варьировать в зависимости от конкретной ткани или органа. Например, в отношении печени известные биомаркеры, ассоциированные с повреждением или повреждением печени, включают, например, аланинтрансферазу (ALT), аминотрансферазу (AST), щелочную фосфатазу или билирубин. Исходный уровень таких маркеров можно определить у субъекта перед началом применения методик по настоящему документу. Нормальных контрольных субъектов также можно использовать в качестве показателей нормальных уровней таких ферментов. Далее, уровни маркеров можно сравнивать между областями ткани или органа, которые были подвергнуты компарментализации, и областями, которые не были подвергнуты компарментализации. Как правило, уровень маркера, такого как ALT, который по меньшей мере в два раза превышает соответствующий уровень в контроле, является показателем повреждения ткани, например повреждения печени.

В следующем примере можно оценить другие маркеры иммунной активации. Маркеры иммунной активации можно оценить в локальной ткани. В других примерах маркеры иммунной активации можно оценить в общей системе кровообращения. В способах по настоящему документу после введения доставляемого агента маркеры иммунной активации, такие как экспрессия цитокинов, значительно не повышаются или не повышаются в общей системе кровообращения у субъекта. Кроме того, при небольшом увеличении их уровня в органе или его части, в которые вводят доставляемый агент, наблюдаемая локальная иммунная активация меньше, чем иммунная активация, наблюдаемая при существующих способах генотерапии. Исходное значение таких маркеров можно определить у нормальных субъектов или у субъекта, подвергнутого лечению, до введения доставляемого агента с применением способа по настоящему документу. Далее, эффекты компарментализации можно определить, сравнивая иммунные маркеры в частях ткани или органа, которые были подвергнуты компарментализации, с иммунными маркерами в частях ткани или органа, которые не были подвергнуты компарментализации.

Например, можно оценить или определить присутствие нейтрализующих антител к доставляемому агенту. В конкретных примерах можно обнаружить вирус-специфичные нейтрализующие антитела. Как правило, у субъекта, которому ввели вирус, например, в способе по настоящему документу, собирают сыворотку. Для оценки присутствия и количества нейтрализующего антитела в сыворотке специалисту в данной области техники известны различные анализы. Например, нейтрализующие антитела можно обнаружить, основываясь на ингибировании сывороткой вирусной функции (Mandel et al. (1978) *Adv. Virus. Res.*, 23:205-68), используя анализ бляшкообразования (Harvey et al. (1999) *J. Virol.*, 73:6729-6742), вестерн-

терн-блоттинг белков капсида аденовируса сывороткой крови человека (Vincent et al. (2001) *J. Virol.*, 75:1516-1521) и основываясь на количественном морфологическом критерии (Vincent et al. (2001). Уровни нейтрализующих антител в сыворотке также можно оценить, используя антивирус-специфичные антитела. Например, можно использовать анти-Ad5 антитело (например, 65H6, Thermo Scientific, Rockford, IL).

В других примерах можно оценить экспрессию цитокинов и, в частности, провоспалительных цитокинов. Ткань или биологическая жидкость (например, периферическая кровь) могут быть обработаны для выделения ДНК или РНК. Можно осуществить ПЦР, такую как ОТ-ПЦР. Коммерчески доступны различные наборы, содержащие реагенты для ОТ-ПЦР цитокинов (см., например, наборы TaqMan® от Life Technologies, Carlsbad, CA). Также могут быть сконструированы праймеры против любого нужного цитокина. В другом примере для оценки экспрессии цитокинов можно использовать твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), иммуноферментный анализ (EIA) или вестерн-блоттинг. Реагенты для оценки уровня цитокинов и других иммунных белков хорошо известны и коммерчески доступны. Например, наборы EIA и ELISA являются коммерчески доступными для многочисленных цитокинов, которые включают, но не ограничиваются ими, IL-6, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, TNF- $\alpha$  и другие. Для подготовки ткани для применения в таких анализах можно использовать методики гомогенизации ткани, которые известны специалисту в данной области техники. Ткань можно гомогенизировать в буфере для гомогенизации, центрифугировать для удаления дебриса и нерастворимого материала, и можно определить общую концентрацию белка (например, используя анализ окрашивания белков с помощью кумасси, способ с применением BCA или другой способ, известный специалисту в данной области техники). Аликвоты центрифугированного супернатанта можно подготовить для вестерн-блоттинга или их можно разбавить и использовать напрямую для анализа на основе ELISA.

#### G. Применения и способы применения.

Предусмотренный здесь компартиментализованный способ обеспечивает устойчивую и продолжительную экспрессию трансгенного продукта на высоком уровне. Соответственно способ можно использовать в различных применениях, включая, но не ограничиваясь ими, в медицинских применениях, в том числе в применениях с целью замены дефектного продукта гена или в применениях для экзогенного введения терапевтического агента; для получения органов для трансплантации; для получения терапевтических белков в трансгенных животных (например, биореакторы); и в сельскохозяйственных, ветеринарных и промышленных применениях. Например, способы можно использовать для клеточной экспрессии выбранного полипептида *in vivo*. В некоторых примерах полипептидный агент может быть полезен в терапевтических целях, в которых полипептид лечит или облегчает расстройство или состояние у субъекта или иным образом улучшает качество жизни субъекта. В других примерах полипептидный агент может быть полезен в сельскохозяйственных целях, например в применениях, которые улучшают качество или количество мясной продукции.

Способ можно осуществить для любого субъекта или пациента, нуждающегося в лечении с помощью генотерапии и поддающегося лечению способом по настоящему документу. Примеры таких субъектов включают, но не ограничиваются ими, мышей, крыс, коров, свиней, овец, коз, лошадей и людей. В конкретных примерах в качестве субъектов для лечения заболеваний или состояний, ассоциированных с генетически обусловленными дефицитами, в настоящем документе рассматриваются дети до 18 лет, в том числе младенцы, дети ясельного или младшего возраста.

Примеры применений способа по настоящему документу предусмотрены ниже. Понятно, что в зависимости от конкретной вводимой молекулы нуклеиновой кислоты существуют другие применения. Выбор представляющей интерес молекулы нуклеиновой кислоты, основываясь на желаемом применении, находится в пределах компетенции специалиста в данной области техники. Описание ниже в настоящем документе приведено только в качестве примера.

#### 1. Лечение заболеваний и расстройств.

В настоящем документе предусмотрены способы лечения заболевания, расстройства или состояния путем доставки молекулы нуклеиновой кислоты субъекту с использованием предусмотренных в настоящем документе способов компартиментализации. Заболевание, расстройство или состояние, подвергаемое лечению, представляет собой любое заболевание, расстройство или состояние, которое поддается лечению экзогенно доставляемой молекулой нуклеиновой кислоты. Например, такие заболевания или расстройства включают любые заболевания или расстройства, лечение которых осуществляют за счет уменьшения или увеличения экспрессии гена, ассоциированного с состоянием, уменьшения или увеличения активности продукта гена, ассоциированного с состоянием, или иного противодействия изменению, ассоциированному с состоянием (например, признаку, симптому или эффекту, ассоциированному с данным заболеванием или состоянием). Например, генотерапию можно использовать для лечения заболеваний или состояний, ассоциированных с генетически обусловленными дефицитами, в том числе моногенных заболеваний (например, гемофилия А и В, сахарный диабет I типа, дефицит альфа-1-антитрипсина (ААТ), муковисцидоз, мышечная дистрофия и множество других), или можно использовать для лечения заболеваний или состояний путем кодирования терапевтического белка, ассоциирован-

ного с облегчением заболевания или состояния (например, рак).

В любом таком примере в настоящем документе доставляемый агент представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты или содержит молекулу нуклеиновой кислоты, которая является терапевтической нуклеиновой кислотой или кодирует терапевтический полипептид. Таким образом, в настоящем документе предусмотрен способ лечения субъекта с заболеванием или расстройством путем компартиментализации органа или его части у субъекта; введения выбранного доставляемого агента, который представляет собой или который содержит представляющую интерес молекулу нуклеиновой кислоты, непосредственно в компартиментализованный орган или его часть на протяжении заранее установленного периода времени после введения нуклеинового агента, как описано в настоящем документе; и восстановления кровообращения через сосуды с органом или его частью.

Предусмотренные в настоящем документе способы можно использовать для лечения широкого спектра заболеваний и расстройств. Доставляемый агент и молекулу нуклеиновой кислоты выбирают на основании расстройства или заболевания, которое нужно лечить, и конкретного затронутого органа. Как описано в настоящем документе, специалист в данной области техники может определить тип молекулы нуклеиновой кислоты в зависимости от конкретного заболевания или расстройства, подвергаемого лечению. В еще одном примере компартиментализованный способ используется для доставки нуклеиновой кислоты, кодирующей CFTR, для лечения муковисцидоза, нуклеиновой кислоты, кодирующей NP2, для лечения боли, нуклеиновой кислоты, кодирующей ингибитор ангиогенеза или онкосупрессор, для лечения рака, нуклеиновой кислоты, кодирующей инсулин или эксендин-4, для лечения диабета.

Также специалисту в данной области техники на основании заболевания или расстройства, подлежащего лечению, известны конкретная ткань или орган для компартиментализации, и конкретный доставляемый агент для введения. В некоторых случаях доставляемый агент не обнаруживает трансдукции в ткань или орган, и, таким образом, доставляется непосредственно в затронутую заболеванием ткань или орган. В других примерах выбирают конкретный доставляемый агент, который обладает тропностью по отношению к ткани или трансдуцируется в ткань после системной экспрессии. Например, AAV-4, AAV-6, AAV-8 и AAV-9 демонстрируют трансдукцию во множестве тканей, в том числе в легкие, сердце, печень, почки, скелетные и сердечные мышцы и, таким образом, могут представлять собой доставляемый агент для системной экспрессии для лечения костных или кардиологических заболеваний и расстройств. В другом примере AAV-9 способен проходить через гематоэнцефалический барьер для трансдукции в центральной нервной системе (ЦНС), и, таким образом, представляет собой доставляемый агент для системной экспрессии для лечения нейродегенеративных расстройств или других заболеваний и расстройств ЦНС.

В частности, легкие являются важным органом-мишенью для генотерапии многих острых и хронических заболеваний, в том числе, среди прочих, рака, астмы, муковисцидоза, дефицита альфа-1-антитрипсина и синдрома дыхательной недостаточности. Мышцы являются органом-мишенью для генотерапии для лечения мышечных или двигательных расстройств, таких как мышечная дистрофия или болезнь Шарко-Мари-Тута (СМТ). Головной мозг является важным органом-мишенью для генотерапии заболеваний двигательных нейронов (например, спинальной мышечной атрофии (АМА), бокового амиотрофического склероза (ALS), связанной с X-хромосомой адренолейкодистрофии (ALD)), болезни Паркинсона или заболеваний и состояний, ассоциированных с отсутствием или дефектом гена, в том числе метаболических или лизосомных расстройств, таких как болезнь Санфилиппо (мукополисахаридоз III типа; MPSIII) или болезнь Канавана. Кожа является органом-мишенью для генотерапии хронических ран, гипертрофических рубцов, келоидов, рака, генетических заболеваний и системных заболеваний. Например, факторы роста (например, PDGF-B, FGF2, VEGF) могут быть направлены в кожу для заживления ран (Liu et al. (2001) *Yonsei Medical Journal*, 42:634-645). Печень может быть органом-мишенью для генотерапии многочисленных наследственных, генетических и метаболических заболеваний и расстройств печени, включая, но не ограничиваясь ими, гемохроматоза, гемофилии А и В, дефицита альфа-1-антитрипсина, болезни Вильсона, синдрома Криглера-Найяра типа I, дефицита орнитинтранскарбамилазы, семейной гиперхолестеринемии типа Па, афибриногенемии, лизосомных заболеваний накопления, заболеваний накопления гликогена, фенилкетонурии, болезни Тея-Сакса, индуцированного гепатита.

Генотерапия доставляемым агентом, содержащим представляющую интерес нуклеиновую кислоту, конкретной ткани или органа может быть осуществлена для системной экспрессии. Например, генотерапевтическую доставку в печень можно использовать для лечения системных заболеваний или состояний, не ассоциированных с печенью, поскольку клеточный аппарат печени может продуцировать и секретировать в кровь большое количество белков. Таким образом, направленную доставку в печень можно использовать для продукции терапевтических белков в кровообращение для лечения различных заболеваний и состояний, включая, но не ограничиваясь ими, факторов свертывания крови, гормонов, факторов роста, цитокинов, метаболических ферментов и анти-протеаз. Печень также можно использовать для дифференциации гепатоцитов в  $\beta$ -клетки, секретирующие инсулин в печени. Генотерапию, направленную на печень, использовали для лечения ряда заболеваний и состояний (Nakai H., "Hepatic Gene Therapy", p. 343-370 in *Molecular Pathology of Liver Diseases* (S.P.S. Monga, ed.)). В другом примере системное заболевание можно лечить с помощью направленной доставки в кожу, потому что кератиноциты

могут продуцировать большие количества белка, который может выделяться в кровообращение. Таким образом, генотерапию кожи можно использовать для доставки нуклеиновой кислоты, кодирующей цитокины (например, интерферон или интерлейкины, или другие цитокины), гормоны (например, инсулин, гормон роста и другие гормоны), факторы коагуляции и другие белки для лечения неопластических, вирусных, воспалительных и генетических заболеваний. Например, генетический дефект, такой как гемофилия В, можно лечить путем доставки фактора IX в кератиноциты.

Более того, количество вводимого доставляемого агента регулируется на основании желаемой терапевтической дозы терапевтической нуклеиновой кислоты или терапевтического полипептида, кодируемого этой молекулой нуклеиновой кислоты. Как описано в настоящем документе, при использовании предусмотренного в настоящем документе компартиментализованного способа, выход белка линейно зависит от дозы доставляемого агента. Таким образом, конкретную дозу доставляемого агента можно определить опытным путем на основании конкретной молекулы нуклеиновой кислоты, доставляемого агента, конкретной генетической терапии, субъекта, которому вводят доставляемый агент, организм или его части, ожидаемого поглощения, необходимого терапевтического количества и других факторов.

Примеры заболевания или расстройства, которые можно лечить доставкой молекулы нуклеиновой кислоты с помощью компартиментализованного способа по настоящему документу, включают, но не ограничиваются ими, наследственные дефициты ферментов (например, мукополисахаридоз, заболевание накопления гликогена и лизосомное заболевание накопления), рак, гемофилию, диабет, мышечную дистрофию, сердечнососудистое заболевание, муковисцидоз, рак, нейродегенеративное расстройство, травму, боль, серповидно-клеточную анемию, аутоиммунное заболевание, воспалительное заболевание, наследственный иммунодефицит, гипертензию и болезнь Паркинсона. Например, заболевание или расстройство выбирают из гемофилии А и В, сахарного диабета типа I, дефицита альфа-1-антитрипсина (ААТ), гемохроматоза, болезни Вильсона, синдрома Криглера-Найяра I типа, дефицита орнитинтранскарбамиллазы, семейной гиперхолестеринемии II типа, афибриногенемии, заболеваний накопления гликогена (GSD) типа Ia, GSD типа Ib, GSD типа II (Помпе), мукополисахаридоза (MPS I), MPS IIIA, MPS IIIB, MPS VII, болезни Фабри, болезни Гоше, синдрома Ниманна-Пика, дефицита орнитинтранскарбамиллазы (ОТС), фенилкетонурии, фиброза печени, ишемически-реперфузионного повреждения печени, болезни Альцгеймера, бокового амиотрофического склероза (ALS), галактоземии, фенилкетонурии, болезни мочи с запахом кленового сиропа, тирозинемии I типа, метилмалоновой ацидемии, цитрулинемии, подагры и синдрома Леша-Нихена, синдрома Слая, синдрома Цельвегера, тяжелого комбинированного иммунодефицита (SCID), муковисцидоза, острой интермиттирующей порфирии, дефицита липопроteinлипазы (LPLD) или рассеянного склероза.

В случае примера с печенью способы по настоящему документу можно использовать для доставки доставляемого агента, содержащего любую нуклеиновую кислоту, такую как любая нуклеиновая кислота, описанная в Разделе D.1, в компартиментализованную печень или часть печени для лечения любого заболевания, для которого в уровне техники была использована генотерапия. Например, в способе по настоящему документу печень (или другая ткань или орган) может быть компартиментализована для доставки и лечения заболеваний и состояний, включая, но не ограничиваясь этим, для доставки фактора VIII для лечения гемофилии А; для доставки фактора IX для лечения гемофилии В; для доставки  $\alpha$  (альфа) 1-антитрипсина для лечения дефицита  $\alpha$ (альфа)1-антитрипсина; для доставки глюкозы-6-фосфатазы- $\alpha$  для лечения заболевания накопления гликогена (GSD) типа Ia; для доставки G6PT для лечения GSD типа Ib; для доставки кислой- $\alpha$ -глюкозидазы для лечения GSD типа II (Помпе); для доставки  $\alpha$ -L-идуронидазы для лечения мукополисахаридоза (MPS I); для доставки сульфамидазы для лечения MPS IIIA; для доставки  $\alpha$ -N-ацетилглюкозаминидазы (NaGlu) для лечения MPS IIIB; для доставки  $\beta$ -глюкуронидазы для лечения MPS VII; для доставки  $\alpha$ -галактозидазы А для лечения болезни Фабри; для доставки глюкоцереброзидазы для лечения болезни Гаучера; для доставки кислой сфингомиелиназы для лечения синдрома Ниманна-Пика; для доставки орнитинтранскарбамиллазы (ОТС) для лечения дефицита ОТС; УДФ глюконозилтрансферазы 1A1 (UGT1A1) для лечения синдрома Криглера-Найяра; рецептора LDL для лечения семейной гиперхолестеринемии; фенилаланин гидроксилазы для лечения фенилкетонурии; металлопротеазы (MMP1 или MMP8); u-PA, антагониста TIMP или молекул анти-HSC для лечения фиброза печени; молекул анти-ROS для лечения ишемически-реперфузионного повреждения печени; предшественника проинсулина или транскрипционных факторов для  $\beta$ -клеточной трансдифференциации для лечения сахарного диабета; интерферирующей РНК против вирусной РНК для лечения гепатита В; интерферирующей РНК против вирусной РНК для лечения гепатита С; p53 для лечения рака печени; IFN- $\beta$  или других противовоспалительных цитокинов для лечения рассеянного склероза; интерферона- $\alpha$  для лечения индуцированного гепатита; или липопроteinлипазы для лечения дефицита липопроteinлипазы (LPLD).

Этот список не является исчерпывающим, поскольку можно лечить любое заболевание или состояние, которое можно лечить с помощью терапевтической нуклеиновой кислоты или терапевтического полипептида, кодируемого этой молекулой нуклеиновой кислоты. Примеры заболеваний и состояний

описаны ниже.

а. Гемофилия А и В.

Примером состояния, которое можно лечить с помощью компартиментализованного способа и материалов по настоящему документу, является гемофилия. Существует два типа гемофилии, А и В. У пациентов с гемофилией А имеется недостаточность белка, известного как фактор VIII, тогда как у пациентов с гемофилией В имеется недостаточность фактора IX. Либо низкие уровни, либо полное отсутствие этих факторов свертывания крови вызывает серьезные затруднения в способности пациента останавливать кровотечение, если он страдает от раны или когда нарушена структура кровеносных сосудов. Это приводит к длительному кровотечению с потенциально фатальными последствиями. Современные способы лечения гемофилии включают периодическую трансфузию препаратов крови или рекомбинантных версий необходимых факторов крови. Тем не менее, несмотря на улучшение скрининга донорской крови, риск вирусной инфекции в результате трансфузии крови или препаратов крови по-прежнему остается проблемой. Более того, в случае терапии факторами VIII или IX, как полученными из препаратов крови, так и имеющими рекомбинантное происхождение, лечение некоторых пациентов осложняется выработкой антител, которые блокируют активность факторов свертывания. Гемофилия считалась идеальным кандидатом для генотерапии, поскольку было показано, что небольшое увеличение уровней фактора VIII или фактора IX достаточно для облегчения многих клинических последствий гемофилии А или В соответственно.

Применяя способ по настоящему документу, доставляемый агент, содержащий ген фактора VIII, можно использовать для лечения гемофилии А. В другом примере, применяя способы по настоящему документу, доставляемый агент, содержащий ген фактора IX, можно использовать для лечения гемофилии В. Настоящий способ дает возможность сделать печень, например небольшую часть печени, эндокринной железой *de novo*, которая может постоянно секретировать необходимый фактор свертывания крови в кровообращение, таким образом, потенциально облегчая последствия заболевания. Это можно достичь, используя способы по настоящему документу, путем непосредственной доставки в паренхиму компартиментализованной ткани или органа, например компартиментализованной печени, например небольшой части печени, рекомбинантного вируса (например, аденовируса) или любого другого типа вектора в качестве доставляемого агента, кодирующего фактор свертывания. Например, конкретным фактором свертывания может быть либо фактор VIII, либо IX в зависимости от лежащего в основе заболевания дефицита. Генетическая информация транскрибируется и транслируется и, таким образом, фактор свертывания синтезируется и секретируется в кровообращение, корректируя нарушение/дефицит свертывания.

б. Семейная гиперхолестеринемия.

Примером состояния, которое можно лечить с помощью компартиментализованного способа и материалов по настоящему документу, является семейная гиперхолестеринемия. Семейная гиперхолестеринемия представляет собой аутосомно-доминантное расстройство вследствие мутации гена рецептора липопротеина низкой плотности (LDLR). Хотя снижение уровня холестерина в плазме крови снижает риск ишемической болезни сердца, пациенты с семейной гиперхолестеринемией обычно плохо поддаются фармакологическому лечению. Субъектов с семейной гиперхолестеринемией подвергали лечению введением нуклеиновой кислоты, кодирующей рецептор липопротеина низкой плотности (см., например, Grossman et al. (1995) *Nat. Med.*, 1:1148-1154; Shichiri et al. (2003) *Gene Ther.*, 10:827-31; Yang et al. (1994) *Immunity*, 1:433-442; Yang et al. (1995) *J. Virol.*, 69:2004-2015; Yang et al. (2004) *Biochem. J.*, 379:89-97). Аналогично, применяя способ компартиментализации по настоящему документу, доставляемый агент, содержащий ген LDLR, можно использовать для лечения семейной гиперхолестеринемии. Это можно достичь, используя способы по настоящему документу, путем непосредственной доставки в паренхиму компартиментализованной ткани или органа, например компартиментализованной печени, например небольшой части печени пациента, рекомбинантного вируса (например, аденовируса) или любого другого типа вектора в качестве доставляемого агента, кодирующего LDLR.

с. Сахарный диабет I типа.

Еще одним примером состояния, которое можно лечить с помощью компартиментализованного способа и материалов по настоящему документу, является диабет I типа. Причиной диабета I типа является неспособность производить инсулин, что, в свою очередь, приводит к заметному повышению уровня глюкозы в крови. Более того, устойчивый высокий уровень глюкозы приводит к нескольким последствиям, которые сильно снижают качество и продолжительность жизни пациента. Диабет является хроническим заболеванием, для которого в настоящее время не существует средства для полного излечения.

Облегчения некоторых патологических эффектов диабета можно достичь за счет частичного восстановления уровня инсулина, используя настоящий способ. Применяя компартиментализованный способ по настоящему документу, доставляемый агент, содержащий ген инсулина, можно использовать для лечения диабета. Это можно достичь, используя способы по настоящему документу, путем непосредственной доставки в паренхиму компартиментализованной ткани или органа, например компартиментализованной печени, например небольшой части печени пациента, доставляемого агента (например, вирусного вектора или другого вектора), кодирующего ген инсулина. Это может привести к стабильному, продол-

жительному синтезу и секреции инсулина трансдуцированными клетками печени.

d. Дефицит альфа-1-антитрипсина (ААТ).

Еще одним примером состояния, которое можно лечить с помощью компартиментализованного способа и материалов по настоящему документу, является распространенное моногенное заболевание легких дефицит альфа-1-антитрипсина (ААТ). ААТ продуцируется печенью и секретируется в кровообращение, откуда он направляется в легкие, где он защищает волокна эластина и другие компоненты соединительной ткани альвеолярных стенок от деградации эластазой нейтрофилов. Дефицит ААТ может привести к смерти пациента по причине эмфиземы. Ген, кодирующий ААТ, был выделен, и экзогенное введение рекомбинантного человеческого белка ААТ представляет собой одну из форм современной терапии этого заболевания.

В ряде исследований также была показана перспективность развития терапевтического подхода, основанного на генотерапии. Способы генотерапии включают, например, трансдукцию скелетных мышечных клеток или клеток печени для экспрессии ААТ (Song et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci., 95:14384-14388; Song et al. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci., 98:4084-8; Song et al. (2001) Gene Ther., 8:1299-1306; Song et al. (2004) Hepatology, 40:918-24; Zhang et al. (2003) Gene Therapy, 10:2148-52; Ferkol et al. (1998) Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., 18:591-601).

Применяя способ по настоящему документу, доставляемый агент, содержащий ген ААТ, можно использовать для лечения дефицита ААТ. Это можно достичь, используя способы по настоящему документу, путем непосредственного введения в паренхиму компартиментализованной ткани или органа (например, такого как мышцы или печень, например, небольшая часть печени) доставляемого агента (например, невирусного или вирусного вектора, такого как аденовирус), кодирующего ААТ. Путем включения последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей ААТ, в вектор и трансдукции части ткани органа с использованием способа по настоящему документу может быть достигнута стабильная продолжительная экспрессия ААТ и потенциально может быть устранена эмфизема.

e. Ангиогенез и рак.

Примером заболевания или состояния, которое можно лечить с помощью компартиментализованного способа по настоящему документу, является ангиогенез. Ангиогенез представляет собой процесс образования новых капилляров из уже существующей сосудистой сети. Это сложный процесс, который включает пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток. Ангиогенез играет фундаментальную роль в репродукции, эмбриональном развитии и заживлении ран. Нерегулируемый ангиогенез, тем не менее, играет ключевую роль в прогрессировании многих заболеваний, таких как рост и метастазирование солидных опухолей, артрит, диабет и некоторые формы слепоты. Например, ангиогенез играет роль в росте и распространении рака за счет кровоснабжения опухолей, которое может питать растущие опухоли и способствовать их метастазированию. Таким образом, антиангиогенные агенты можно использовать для лечения рака и других заболеваний, в которых ангиогенез играет важную роль.

Ангиогенез контролируется сложными взаимодействиями между проангиогенными факторами роста, таким как VEGF, FGF и PDGF, и антиангиогенными факторами, таким как эндостатин и ангиостатин. Отсутствие равновесия между этими двумя группами факторов порождает патологический ангиогенез. В нескольких направлениях исследований было выдвинуто предположение, что инфузия антиангиогенных факторов пациенту с раком, таких как эндостатин или ангиостатин, будет восстанавливать баланс между этими двумя силами, останавливать ненормальный ангиогенез и, таким образом, останавливать рост и метастазирование опухоли.

Применяя способ по настоящему документу, доставляемый агент, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую антиангиогенный фактор, можно использовать для лечения ангиогенных заболеваний и состояний, таких как рак, артрит, диабет и слепота. Это можно достичь, используя способы по настоящему документу, путем непосредственного введения в паренхиму компартиментализованной ткани или органа (например, такого как печень, например, небольшая часть печени) доставляемого агента (например, невирусного или вирусного вектора, такого как аденовирус), кодирующего антиангиогенный фактор, такой как эндостатин или ангиостатин. Путем включения последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей антиангиогенный фактор, в вектор и трансдукции части ткани органа с использованием способа по настоящему документу может быть достигнута стабильная продолжительная экспрессия антиангиогенного агента.

f. Аутоиммунные и воспалительные расстройства (например, рассеянный склероз).

Примерами заболевания или состояния, которое можно лечить с помощью компартиментализованного способа по настоящему документу, являются аутоиммунные и воспалительные расстройства, такие как рассеянный склероз (РС), ревматоидный артрит, остеоартрит, диабет, болезнь Крона, синдром Шегрена, муковисцидоз, миозит и системная красная волчанка. Например, РС представляет собой аутоиммунное воспалительное заболевание центральной нервной системы (ЦНС), при котором повреждаются липидные миелиновые оболочки вокруг аксонов головного и спинного мозга. Результатом этого является то, что аксоны больше не могут проводить сигналы.

Лечение аутоиммунных воспалительных расстройств, таких как РС и другие состояния, с помощью генотерапии направлено на иммунную активацию с использованием цитокинов, антагонистов цитокинов,

моноклональных антител против Т-клеток, ингибиторов передачи сигнала. Например, для понижающего модулирования иммунного ответа могут быть введены противовоспалительные гены (Neumann et al. (2005) *Gene Therapy and Molecular Biology*, 9:61-76). Примеры противовоспалительных генов включают цитокины и другие иммуномодулирующие агенты, такие как, например, интерлейкин-4, интерлейкин-10, трансформирующий фактор роста b, интерферон-бета (IFN $\beta$ ), рецептор интерлейкина-1 альфа (IL-1R $\alpha$ ), растворимый рецептор TNF (sTNF-R), растворимый рецептор интерлейкина-1 (sIL-1R) или растворимый рецептор интерферона-гамма (sIFN $\gamma$ R). Например, лечение с помощью интерферона-бета было одобрено для РС (Kieseier et al. (2007) *Exp. Neurol.*, 203:1-4). В дополнение к вирусным и невирусным подходам генотерапии лечение РС включает применение клеток, полученных от целевого субъекта, подлежащего лечению (например, дендритные клетки или Т-клетки), которые изменены таким образом, чтобы экспрессировать противовоспалительный цитокин (например, IFN- $\beta$ , IL-10 или IL-4) и которые далее вводят обратно субъекту-хозяину для доставки продукта гена.

Применяя способ по настоящему документу, доставляемый агент, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую противовоспалительный ген или цитокин, можно использовать для лечения аутоиммунного и воспалительного заболевания, такого как рассеянный склероз (РС), ревматоидный артрит, остеоартрит, диабет, болезнь Крона, синдром Шегрена, муковисцидоз, миозит и системная красная волчанка. В конкретных примерах доставляемый агент, кодирующий нуклеиновую кислоту, кодирующую противовоспалительный ген или цитокин (например, IFN- $\beta$ , IL-10 или IL-4), используется для лечения РС. Это можно достичь, используя способы по настоящему документу, путем непосредственной доставки в паренхиме компартментализованной ткани или органа (например, такого как печень, например, небольшая часть печени) доставляемого агента (например, невирусного, вирусного вектора, такого как аденовирус, или целых клеток), кодирующего противовоспалительный ген или цитокин (например, IFN- $\beta$ , IL-10 или IL-4). Путем включения последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей противовоспалительный ген или цитокин, в вектор, и трансдукции части ткани органа с использованием настоящего способа, может быть достигнута стабильная продолжительная экспрессия противовоспалительного агента.

г. Острая интермиттирующая порфирия (AIP).

Примером заболевания или состояния, которое можно лечить с помощью компартментализованного способа по настоящему документу, является острая интермиттирующая порфирия (AIP). AIP представляет собой наследственное метаболическое заболевание, характеризующееся дефицитом порфобилиногендезаминазы (PBGD), третьего фермента пути синтеза гема. У людей, наследующих этот генетический признак, активность фермента составляет ~50% от нормальной. Заболевание наследуется по ауто-сомно-доминантному типу и является наиболее распространенной острой порфирией. Хотя оно встречается во всех расах, оно наиболее распространено в Северной Европе, в основном в Швеции, Великобритании и Ирландии. В США и других странах оцениваемая встречаемость составляет 5/100,000, а в Северной Швеции она составляет вплоть до 60-100/100,000. К настоящему времени было описано более 225 мутаций в гене PBGD. Доминирующим клиническим признаком является острый интермиттирующий приступ вследствие дисфункции нервной системы, в том числе абдоминальная боль и нейровегетативные нарушения, а также нарушения кровообращения. Об абдоминальной боли сообщается в 85-95% случаев, и она является наиболее распространенным признаком, следующим после или ассоциированным с неврологическими изменениями. Если AIP не распознается и применяются опасные лекарства, такие как лекарства, метаболизируемые печеночными ферментами системы цитохрома P450, это может спровоцировать приступ, что может привести к прогрессированию дыхательного и бульбарного паралича и смерти. Внезапная смерть может также произойти в результате сердечной аритмии. Также иногда встречаются первичный рак печени и нарушение функции почек.

У значительной доли субъектов, которые наследуют мутацию PBGD, никогда не развиваются симптомы порфирии, т.е. клиническая пенетрантность заболевания является очень низкой. Клинические симптомы у носителей AIP ассоциированы с увеличенной продукцией и экскрецией предшественников порфирина, дельта-аминолевулиновой кислоты (ALA) и порфобилиногена (PBG), причиной которых является увеличение потребности в синтезе гема из-за лекарств или других факторов, провоцирующих острый приступ. В этих условиях дефицит PBGD лимитирует синтез гема, что приводит к нарушению опосредованной гемом репрессии ALA синтетазы (ALAS1). Существует доказательство того, что печень является основным источником избытка предшественников порфирина. У тех субъектов, которые подвержены повторяющимся кризам порфирии, содержание этих соединений остается повышенным между приступами и увеличивается дальше во время криза. Их содержание может снизиться до нормального, если заболевание остается неактивным на протяжении длительного периода времени.

Острые приступы обычно возникают после периода полового созревания и могут быть вызваны у латентных пациентов эндокринными факторами и стероидными гормонами, а также различными факторами окружающей среды, в том числе лекарствами, факторами, относящимися к питанию, ограниченным потреблением углеводов и калорий, курением, стероидными гормонами и оральными контрацептивами, отравлением свинцом, интеркуррентными инфекциями, операцией и психологическим стрессом. Лекар-

ства являются одним из самых важных факторов, которые провоцируют острые приступы, и список безопасных лекарств доступен на [www.drugs-porphyrria.com](http://www.drugs-porphyrria.com). Курение, этанол и лекарства, метаболизирующиеся под действием CYP450, значительно увеличивают печеночную потребность в геме и приводят к индукции ALAS1, которая увеличивает продукцию предшественников порфирина и провоцирует острый приступ. Также ALAS1 позитивно регулируется коактиватором 1 $\alpha$  рецептора  $\gamma$ , активируемого пролифератором пероксисом (PGC1 $\alpha$ ), который индуцируется в печени при голодании. Среди провоцирующих факторов, по всей видимости, важную роль играют стероидные гормоны. Эту идею подтверждают те факты, что заболевание редко проявляется до периода полового созревания и что оральные контрацептивы могут обострять приступы у некоторых женщин с дефицитом PBGD. Также женщины (80%) страдают чаще, чем мужчины (20%).

Острые приступы лечат инфузиями глюкозы и гемина (Normosang, Orphan Europe). Глюкоза является антагонистом индукции ALAS1, опосредованной PGC1 $\alpha$ . Гемин восстанавливает регуляторный пул гема и супрессирует индукцию ALAS1 в печени. У некоторых женщин развиваются предменструальные приступы, которые можно предотвратить с помощью аналогов гонадотропин-высвобождающего гормона (GnRH). У некоторых пациентов наблюдаются повторяющиеся острые приступы и значительные, инвалидизирующие неврологические нарушения. Прогрессирующее неврологическое повреждение и подострые и хронические симптомы, как правило, не восприимчивы к терапии гемом. Это опасное для жизни состояние, которое можно вылечить только аллогенной трансплантацией печени, которая на сегодняшний день у трех пациентов предотвратила накопление нейротоксичных ALA и PBG. Тем не менее, трансплантация печени имеет ограничения по доступности совместимых доноров, а также характеризуется значительной тяжестью и смертностью.

Генная заместительная терапия является альтернативой трансплантации печени, в особенности для пациентов, у которых функция печени в целом не нарушена, за исключением дефицита PBGD. Перенос гена PBGD, опосредованный аденовирусным вектором, в мышь с порфирией обнаруживает непродолжительную терапевтическую эффективность как результат временной экспрессии PBGD в печени (Johanson, 2004, *Mol. Ther.* 10(2):337-43). Генотерапия, опосредованная аденовирусом и аденоассоциированным вирусом, геном, кодирующим PBGD, также разрабатывается Amsterdam Molecular Therapeutics и другими компаниями (см., например, опубликованную заявку США № US2011/0262399 и европейский патент № EP1049487).

Применяя способ по настоящему документу, доставляемый агент, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую PBDG, можно использовать для лечения острой интермиттирующей порфирии (AIP). Это можно достичь, используя способы по настоящему документу путем непосредственной доставки в паренхиму компартиментализованной ткани или органа (например, такого как печень, например, небольшая часть печени) доставляемого агента (например, невирусного вектора, вирусного вектора, такого как аденовирус, или целых клеток), кодирующего PBDG. Путем включения последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей PBDG, в вектор и трансдукции части ткани органа, используя настоящий способ, можно достичь стабильной и продолжительной экспрессии PBDG для лечения AIP.

#### h. Синдром Санфилиппо.

Примером состояния, которое можно лечить с помощью компартиментализованного способа и материалов по настоящему документу, является синдром Санфилиппо. Синдром Санфилиппо или мукополисахаридоз III типа (MPSIII) представляет собой лизосомное заболевание накопления, при котором ауто-сомный рецессивный дефект приводит к накоплению частично деградированных олигосахаридов гепарансульфата. Частота встречаемости составляет примерно 1 на 70,000 новорожденных. Синдром Санфилиппо ассоциирован со снижением способности к обучению в раннем детстве, задержкой или отставанием в росте, задержанным развитием и ухудшением психического состояния. Существует четыре подтипа синдрома Санфилиппо: синдром Санфилиппо типа A (MPSIIIA), причиной которого является отсутствие или изменение фермента гепаран N-сульфатазы; синдром Санфилиппо типа B (MPSIIIB), причиной которого является отсутствие, изменение или недостаточность фермента альфа-N-ацетилглюкозаминидазы (NaGlu); синдром Санфилиппо типа C (MPSIIIC), причиной которого является отсутствие, изменение или недостаточность фермента ацетил-CoA-альфа-глюкозаминид ацетилтрансферазы; и синдром Санфилиппо типа D (MPSIIID), причиной которого является отсутствие, изменение или недостаточность фермента N-ацетилглюкозамин 6-сульфатазы. Например, синдром Санфилиппо типа B возникает в результате мутаций гена NaGlu, что приводит к дефициту фермента альфа-N-ацетилглюкозаминидазы.

Лечение синдрома Санфилиппо, такого как MPS IIIA, IIIB, IIIC или IIID, может быть достигнуто путем доставки отсутствующего или дефектного гена. Доставка может быть проведена непосредственно в центральную нервную систему (ЦНС). Доставку также можно осуществить способами доставки, которые обеспечивают эффективную доставку в ЦНС через гематоэнцефалический барьер, например, с использованием серотипа аденоассоциированного вируса, способного проходить через гематоэнцефалический барьер из сосудистого русла. Примером такого серотипа является AAV9 (см., например, Fu et al. (2011) *Mol. Ther.*, 19:1025-33).

Применяя способ по настоящему документу, для лечения MPSIIIA можно использовать доставляе-

мый агент, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую гепаран N-сульфатазу, для лечения MPSIII можно использовать доставляемый агент, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую альфа-N-ацетилглюкозаминидазу (NAcGlu), для лечения MPSIIIC можно использовать доставляемый агент, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую ацетил-CoA-альфа-глюкозаминид ацетилтрансферазу, или для лечения MPSIIID можно использовать доставляемый агент, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую N-ацетилглюкозамин 6-сульфатазу. Это можно достичь, используя способы по настоящему документу, путем непосредственной доставки в паренхиму компартментализованной ткани или органа (например, такого как печень, например, небольшая часть печени; или непосредственно в мозг) доставляемого агента (например, невирусного вектора, вирусного вектора, такого как аденовирус, или целых клеток), кодирующего отсутствующий или дефектный фермент для конкретного расстройства MPSIII. В конкретных примерах доставляемый агент представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус 9, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую отсутствующий или дефектный фермент (например, rAAV9-hNAGLU), чтобы обеспечить доставку через гематоэнцефалический барьер. Путем включения последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей отсутствующий или дефектный фермент, в вектор и трансдукции части ткани или органа (например, печени), используя настоящий способ, можно достичь стабильной и продолжительной экспрессии в ЦНС отсутствующего или дефектного фермента для лечения MPSIII (синдрома Санфилиппо).

#### 1. Дефицит липопротеинлипазы (LPLD).

Примером состояния, которое можно лечить с помощью компартментализованного способа и материалов по настоящему документу, является дефицит липопротеинлипазы (LPLD; также известный как гиперлипидемия 1 типа, первичная гиперлипидемия или семейная гиперхиломикронемия). Причиной LPLD являются изменения гена, кодирующего липопротеинлипазу (LPL). В отсутствие LPL или в случае дефектной LPL увеличиваются уровни жира в крови из-за дефектов метаболизма длинноцепочечных жирных кислот. Симптомы, ассоциированные с LPLD, включают, например, абдоминальную боль и панкреатит. LPLD также ассоциирован с высокими уровнями триглицеридов в крови, что может predispose субъекты к диабету и атеросклерозу с ранним началом.

Для лечения LPLD можно использовать генотерапию. Например, аденоассоциированные вирусы (AAV), содержащие нуклеиновую кислоту, кодирующую ген LPL, были одобрены в Европе для доставки в скелетные мышцы для лечения LPLD (доступны на рынке как Glybera®).

Применяя способ по настоящему документу, доставляемый агент, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую LPL, можно использовать для лечения дефицита липопротеинлипазы (LPLD). Это можно достичь, применяя способ по настоящему документу, путем непосредственной доставки в паренхиму компартментализованной ткани или органа (например, такого как печень, например, небольшая часть печени; или скелетная мышца) доставляемого агента (например, невирусного, вирусного вектора, такого как аденовирус, или целой клетки), кодирующего LPL. Посредством включения последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей LPL, в вектор и трансдукции ткани органа с использованием настоящего способа, можно достичь стабильной продолжительной экспрессии LPL для лечения LPLD.

#### 2. Экспрессия и продукция белка.

В настоящем документе предусмотрен способ получения полипептида в животном. Терапевтическая продукция белков в животных, в том числе терапевтических белков или пищевых добавок, хорошо известна специалисту в данной области техники. Например, такие продукты как тканевой активатор плазминогена (t-PA), инсулин, гормон роста и факторы коагуляции, получают в животных, таких как коровы, овцы или козы (см., например, Mercier J.C. (1987) *Exploiting New Technologies in Animal Breeding*, p. 122-131, Oxford University Press; Lilloco et al. (2005) *Drug Discovery Today*, 10:191-196; Echelard et al. (2006) *Biopharm International*, 19:36; Prather et al. (2003) *Theriogenology*, 59:115-123). Также была описана продукция продуктов генов в клетках насекомых с использованием вирусных векторов, экспрессирующих нужный продукт, (см., например, опубликованная заявка США № US2011/0119777)

Способ продукции белка в животном, такой как любой описанный в настоящем документе или известный в данной области техники способ, включает стадии введения доставляемого агента, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую данный полипептид, в компартментализованный орган или его часть продуцирующего животного, поддержания продуцирующего животного в условиях, которые способствуют экспрессии данного полипептида, и выделения экспрессированного полипептида из продуцирующего животного (например, из крови или другой биологической жидкости продуцирующего животного). Кодированный полипептид может представлять собой любой белок, который желательно производить, в частности, любой терапевтический белок или белок, который можно использовать в качестве пищевой добавки. Примеры таких белков включают, но не ограничиваются ими, факторы коагуляции (например, фактор VIII, фактор IX, фибриноген), лактоферрин, гемоглобин, человеческий белок C, альфа-1-антитрипсин, тканевой активатор плазминогена (t-PA), трансмембранный регулятор проводимости при муковисцидозе (CFTR), инсулин, гормоны роста, цитокины, моноклональные антитела, вакцины (например, антигены), холестеролоксидаза и другие.

Полипептид можно выделить из биологического образца от продуцирующего животного. Биологический образец может представлять собой кровь, мочу, молоко, плазму, слюну или любой другой подоб-

ный образец. В конкретных примерах белковые продукты появляются в молоке и могут использоваться напрямую или могут быть выделены из молока. Производящим животным может быть кролик, крыса, мышь, коза, лошадь, овца, цыпленок, курица, свинья или бык. Способ обеспечивает преимущества по сравнению с существующими в настоящее время способами продукции, потому что способ может быть масштабирован для продукции полипептида в больших количествах, в особенности в крупных животных, таких как свиньи и коровы. Более того, как описано выше в настоящем документе, полипептиды могут быть посттрансляционно модифицированы (например, гликозилированы) клетками продуцирующего животного.

### 3. Сельскохозяйственные и ветеринарные применения.

Способ, предусмотренный в настоящем документе, можно использовать для применения в генотерапии животных и, в частности, в ветеринарных, сельскохозяйственных или промышленных применениях. В таких примерах доставляемый агент для доставки в способах по настоящему документу содержит молекулу нуклеиновой кислоты, которая влияет на увеличение производительности и/или контролирует заболевание у животного. Применения на животных включают, но не ограничиваются ими, применения, которые изменяют животных для придания им желаемых свойств или дают животных с желаемыми свойствами, увеличивают качество животных (например, мышцы, молоко, шерсть), увеличивают устойчивость к заболеваниям или приводят к повышенной выработке продуктов для промышленных применений (например, шелк). Например, применения в генотерапии включают увеличение роста волос у животных, усиление роста животного или регуляцию синтеза или использования питательных веществ. В таких примерах молекула нуклеиновой кислоты кодирует белок, который увеличивает образование мышц у животного, увеличивает рост волос у животного, увеличивает образование шерсти у животного, усиливает рост животного или участвует в синтезе или использовании питательных веществ.

Такие применения хорошо известны специалисту в данной области техники. Например, доставляемый агент, содержащий нуклеиновую кислоту, можно вводить животному для увеличения образования мышц у животного, например, путем введения нуклеиновой кислоты, кодирующей гормон роста (например, соматотропин), или агенты, которые опосредуют действие гормона роста (например, IGF-1, рилизинг фактор гормона роста или Ski курицы (cSki) (см., например, Lee (1997) *Theriogenology*, 47:225; Palmiter et al. (1982) *Nature*, 300:611-615)). В другом примере молекула нуклеиновой кислоты может представлять собой или кодировать ингибитор миостатина, который можно использовать в производстве мяса. Например, молекула нуклеиновой кислоты может кодировать фоллистатин, который блокирует связывание миостатина с его рецептором, тем самым приводя к развитию более крупных мышц.

В другом примере можно улучшить качество животного и продуктов из него. В таких примерах улучшение общего качества животного может способствовать сельскохозяйственным применениям (например, для использования молока, яиц или мяса). В одном из примеров доставляемый агент, содержащий нуклеиновую кислоту, можно вводить животному для увеличения производства молока или для повышения качества молока (см., например, Mercier J.C. (1987) *Exploiting New Technologies in Animal Breeding*, p. 122-131, Oxford University Press). Кроме того, молоко животных также было модифицировано способами генотерапии для увеличения или улучшения качества молока, например, для потребления человеком. Например, был сконструирован лактоферрин для экспрессии в молоке коров для обеспечения более сбалансированного по питательным веществам продукта для потребления детьми или людьми пожилого возраста (см., например, van Berkel et al. (2002) *Nat. Biotech.*, 20:484-487). Также молоко животных можно улучшить путем ингибирования роста бактерий, которые вызывают мастит (например, Maga et al. (2006) *Foodborne Pathog. Dis.*, 3:384-392). В других примерах могут быть созданы животные, которые экспрессируют ген десатуразы жирных кислот (см., например, Saeki et al. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 101:6361-6366), для обогащения омега-3 жирными кислотами (см., например, Lai et al. (2006) *Nature Biotechnology*, 24:435-436); дают молоко с более высоким содержанием бета-казеина и каппа-казеина (см., например, Brophy et al. (2003) *Nature Biotechnology*, 21:157-162), или которые экспрессируют слюнную фитазу для производства низкофосфористого навоза (см., например, Golovan et al. (2001) *Nature Biotechnology*, 19:741-745). В следующем примере молекулы нуклеиновых кислот включают такие молекулы нуклеиновых кислот, которые участвуют в биосинтезе аминокислот, или гены гликосилатного цикла, которые можно использовать для улучшения использования питательных веществ. Например, можно вводить доставляемый агент, который содержит молекулу нуклеиновой кислоты, такую как гены *cysE* и *cssK*, которые кодируют серин трансацетилазу и о-ацетилсерин сульфгидрилазу.

В дополнительных примерах доставляемый агент, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, можно вводить животному для увеличения устойчивости животных к заболеванию. Например, можно получить животное, которое не содержит белок приона (Richt et al. (2007) *Nature Biotechnology*, 25:132-138). В других примерах можно создать животное, устойчивое к бактериальным инфекциям, таким как инфекция *Staphylococcus aureus* (Wall et al. (2005) *Nature Biotechnology*, 23:445-451).

В дополнительных примерах молекулы нуклеиновых кислот могут кодировать полипептиды, которые увеличивают рост волос или увеличивают образование шерсти у животного. В конкретных примерах таких аспектов животное представляет собой овцу или ягненка или другое животное, имеющее волосы, подходящие для производства волос или шерсти. Например, образование шерсти можно увеличить путем

введения в волосяные фолликулы кожи доставляемого агента, который содержит молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую цистеин, являющийся лимитирующей аминокислотой в синтезе шерсти; молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую кератин, или молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую факторы роста (например, EGF or IGF-1). Также можно создать животных для промышленного применения, например для производства шелка, генетически конструируя ген паука, что дает возможность производить шелк в животных, таких как козы (см., например, Lazaris et al. (2002) Science, 295:472-476).

Н. Примеры.

Следующие примеры включены только в качестве иллюстрации и не предназначены для ограничения объема данного изобретения.

Пример 1. Компартиментализация трансдукции аденовируса в хвостовую долю.

Аденовирус инъецировали в хвостовую долю, которая была компартиментализована путем изоляции от сосудистой системы с использованием зажима на паренхиме. Аденовирус, обозначенный как Ad-CMV-Luc, был предоставлен David T. Curiel (University of Alabama, см., например, Bass et al. (1995) Cancer Gene Ther., 2:97-104; опубликованная международная заявка PCT № WO1995/026411). Ad-CMV-Luc был получен из аденовируса типа 5 человека и кодирует ген люциферазы под контролем промотора цитомегаловируса (CMV). Так, для анализа аденовирусной трансдукции создавали дефектный по репликации аденовирус, удаляя район E1. В этот удаленный (делетированный) район E1, клонировали репортерный ген люциферазы (Adluc), сконструированный таким образом, чтобы он находился под контролем человеческого промотора цитомегаловируса (обозначенный rAd-CMV-Luciferase или Ad.CMV.Luc).

Для определения степени трансдукции аденовируса, которая могла быть компартиментализована в хвостовой доле печени, десять (10) крыс анестезировали внутрибрюшинной (IP) инъекцией пентобарбитала натрия (50 мг/кг) (Abbott Laboratories, Chicago, IL). Каждую крысу затем помещали в положение лежа на спине, выбривали брюшную область и делали 3 см вентральный срединный разрез брюшной полости от мечевидного отростка к пупочной области. Определяли расположение верхней части хвостовой доли и вырезали ее, отделив междольчатые и печеночно-желудочную связки. Идентифицировали сосудистую ножку хвостовой доли и зажимали ее с помощью 10-мм микрососудистого зажима (Fine Science Tools-USA Inc., Foster City, CA).

После того как хвостовая доля была зажата, в паренхиме хвостовой доли 5 крыс инъецировали  $1 \times 10^9$  БОЕ рекомбинантного Ad.CMV.Luc в 50 мкл фосфатно-солевого буфера (PBS) в 1-мл шприце (Becton & Dickinson Corp., Franklin, NJ). Другим 5 крысам в полую вену инъецировали  $1 \times 10^9$  БОЕ Ad.CMV.Luc в общем объеме 100 мкл PBS в качестве контроля. Зажим оставляли на 30 мин. Крысам далее накладывали швы в двух плоскостях (мышцы и кожа) с помощью 5-0 Викрила (Ethicon Inc., Somerville, NJ) и оставляли до восстановления.

Через 72 ч после операции крыс умерщвляли, вводя внутрибрюшинно повышенную дозу пентобарбитала натрия. Печень собирали и хвостовую, правую латеральную, левую латеральную и среднюю доли печени разделяли и подготавливали для гистопатологической оценки, анализа активности люциферазы и для экстракции нуклеиновых кислот (ДНК и РНК).

Для экстракции ДНК 10 мг ткани помещали в 400 мкл раствора 100 mM NaCl, 10 mM Tris $\times$ Cl, pH 8, 0,5% SDS, 0,1 мг/мл протеиназы К и инкубировали до тех пор, когда большая часть клеточного белка деградировала. Расщепленную смесь депротеинизировали последовательными экстракциями фенолом/хлороформом/изоамиловым спиртом, ДНК выделяли преципитацией этанолом, высушивали и ресуспендировали в буфере TE, pH 8.

Фиксированную в формалине ткань заливали в парафин и использовали для рутинной гистопатологии. Для гистопатологии вырезали 5-мм блоки ткани, фиксированной в формалине и залитой в парафин, окрашивали их гематоксилином и эозином, и дипломированный патолог исследовал их под микроскопом.

Для анализа активности люциферазы вырезанные доли гомогенизировали, используя систему подготовки образцов Fast Prep 24 (MP Biomedicals) с использованием Lysing Matrix D (MP Biomedicals) в 500 мкл лизирующего буфера (Luciferase assay system, Promega, Madison, WI). 20 мкл супернатанта добавляли к 100 мкл реагента для анализа люциферазы и далее использовали для измерения активности люциферазы с помощью люминометра (Biotek, USA) для измерения фотонов в течение 10 с. Концентрацию белка в экстракте печени определяли с помощью метода Бредфорда, используя набор для анализа белка (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Активность люциферазы нормировали на общий белок в гомогенатах (относительные световые единицы на грамм (ОСЕ/г) общего белка) для сравнения и статистического анализа активности для разных долей печени.

Результаты.

Был проведен гистологический анализ на наличие воспаления в печени. Для сравнения влияния компартиментализации и внутривенной трансфузии на воспаление в печени срезы печени, полученные через 72 ч, анализировали на наличие признаков инфильтрации нейтрофилами. Гистологический анализ печени, проведенный для контрольных образцов после внутривенного введения, показал интенсивный фокальный гепатоцеллюлярный некроз, особенно в околопортальных областях. Эти фокальные некрози-

ческие участки были инфильтрованы нейтрофилами. Гепатоцеллюлярный некроз, непаренхимные клетки или инфильтрирующие воспалительные клетки практически полностью отсутствовали в тканях, полученных из компартиментализованных животных.

Для активности люциферазы результаты демонстрируют, что аналогичные уровни активности люциферазы были измерены во всех долях, выделенных из контрольных животных, которые получали аденовирус путем внутривенной (IV) инфузии. В противоположность этому, у животных, которые получали аденовирус путем инъекции в хвостовую долю после зажатия, наблюдаемая активность люциферазы в этой доле была на 3 порядка выше, чем в любой из других долей печени, что свидетельствует о том, что аденовирусная трансдукция была ограничена тканью, в которую осуществлялась инъекция, и окружающие ткани были избавлены от воздействия вектора. Результаты приведены на фиг. 2.

Пример 2. Определение продолжительности наложения зажима для минимизации системного высвобождения.

А. Системная вирусная экспрессия после снятия зажима.

Для определения оптимальной продолжительности наложения зажима для осуществления компартиментализации аденовируса в ткани, в которую была осуществлена инъекция, проводили хирургическую операцию, как описано в примере 1, с последующей инъекцией в паренхиму хвостовой доли  $1 \times 10^{10}$  БОЕ Ad.CMV.Luc, суспендированного в общем объеме 50 мкл, с использованием 1 мл шприца для инсулина. Микросудистый зажим снимали с сосудистой ножки через 7, 15, 30 и 60 мин после инъекции аденовируса ( $n = 6$  для периода времени). Через 1 мин после снятия зажима из поллой вены собирали 200 мкл периферической крови и подготавливали ее для ПЦР. Ген люциферазы амплифицировали, используя следующие праймеры: смысловой 5'-ATGGAAGACGCCAAAAACATAAAG-3' (SEQ ID NO:1) и антисмысловой 5'-AAAACCGGGAGGTAGATGAGATGT-3' (SEQ ID NO:2) в общем реакционном объеме 20 мкл. Условия ПЦР были следующие:  $94^\circ\text{C}$  в течение 5 мин, далее 25 циклов при  $94^\circ\text{C}$  в течение 30 с,  $55^\circ\text{C}$  в течение 30 с и  $72^\circ\text{C}$  в течение 30 с и 7 мин при  $72^\circ\text{C}$  удлинения.

Результаты приведены на фиг. 3, область А. Аденовирусная ДНК (Luciferase) была обнаружена в периферической крови через 7 мин после наложения зажима. С увеличением времени наложения зажима до 15 мин количество аденовирусной ДНК, обнаруженной в крови, снизилось до примерно половины от количества, наблюдаемого через 7 мин после наложения зажима. Аденовирусная ДНК не была обнаружена в периферической крови через 30 и 60 мин после наложения зажима, что свидетельствует о том, что продолжительность зажатия, составляющая по меньшей мере 30 мин, ограничивает аденовирус тканью, в которую была осуществлена инъекция.

В. Системное присутствие аденовирусной ДНК в процессе зажатия и после снятия зажима.

Для подтверждения приведенных выше результатов оценки наличия аденовирусной ДНК в периферической крови после 30 мин наложения зажима проводили исследование зависимости наличия аденовируса в периферической крови в процессе зажатия и после снятия зажима через 30 мин ( $n = 3$ ) от времени. После зажатия хвостовой доли проводили хирургическую операцию, описанную в примере 1, после в паренхиму хвостовой доли инъецировали  $1 \times 10^{10}$  БОЕ Ad.CMV.Luc, суспендированного в общем объеме 50 мкл, используя 1 мл шприц для инсулина. Далее, 100 мкл крови брали из поллой вены через 1, 3 и 5 мин после инъекции аденовируса (в процессе зажатия) и через 1, 3 и 5 мин после снятия зажима (после снятия зажима). Зажим накладывали на место на 30 мин. В образцах крови анализировали наличие аденовирусной ДНК путем амплификации гена Luciferase с помощью ПЦР, как описано выше в настоящем документе. 10 мкл аденовируса Ad.CMV.Luc использовали в качестве положительного контроля (С+).

Результаты приведены на фиг. 3, область В. Аденовирусная ДНК не была обнаружена в крови ни в одном из тестируемых периодов времени, но была обнаружена в образце положительного контроля. Эти результаты свидетельствуют о том, что процедура наложения зажима предотвращает попадание инъецированного аденовируса в кровоток, если присутствует зажим. Результаты также подтверждают, что время зажатия 30 мин достаточно для трансдукции вируса в клетки ткани, в которые была осуществлена инъекция, о чем свидетельствует не обнаруживаемое количество вируса в крови в течение до 5 мин после снятия зажима.

Пример 3. Дозозависимая кинетика экспрессии трансгена.

Для определения взаимосвязи между экспрессией белка и введением аденовируса строили кривую зависимости ответа от дозы после хирургической операции и наложения зажима, как описано в примере 1 ( $n = 6$ /группа дозирования). Каждой группе делали инъекцию  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^9$  или  $1 \times 10^{12}$  БОЕ Ad.CMV.Luc в 50 мкл PBS, как описано ранее. Контрольным группам крыс, которых подвергали хирургической операции, инъецировали соответствующие дозы аденовируса в общей объеме 100 мкл PBS непосредственно в полую вену ( $n = 6$ /группа дозирования). После инъекции крысам накладывали швы, как описано в примере 1, и оставляли для восстановления. Через 72 ч после операции крыс умерщвляли, как описано в примере 1, собирали хвостовые доли печени и подготавливали их для анализа активности люциферазы, как описано в примере 1. Поскольку активность люциферазы пропорциональна количеству синтезированного белка люциферазы, присутствующего в образце, этот показатель использовали как показатель синтезированного трансгенного белка.

Результаты приведены на фиг. 4. Активность/экспрессия люциферазы увеличивалась линейно с увеличением дозы вектора, изменяясь от примерно  $2,5 \times 10^2$  ОСЕ/г белка для тканей, в которые было инъецировано  $10^3$  БОЕ аденовируса, до более чем  $5 \times 10^9$  ОСЕ/г белка для тканей, в которые было инъецировано  $10^{12}$  БОЕ. Эти результаты демонстрируют, что существует корреляция между дозой вектора и выходом белка.

Пример 4. Продолжительность экспрессии трансгена.

Устойчивость экспрессии трансгена определяли, измеряя экспрессию трансгена (активность люциферазы) в последовательные временные точки после введения аденовируса. С этой целью крыс ( $n=6$ /временную точку) подвергали хирургической операции, как описано в примере 1, и после зажатия хвостовой доли в хвостовую долю каждого животного инъецировали  $1 \times 10^9$  БОЕ Ad.CMV.Luc в 50 мкл PBS, следуя протоколу, приведенному в примере 1.

Контрольную группу крыс ( $n=5$ ) подвергали той же самой хирургической операции, что экспериментальную группу, но делали внутривенную (IV) инъекцию  $1 \times 10^9$  БОЕ Ad.CMV.Luc, в 100 мкл PBS в полую вену. После введения аденовируса крысам накладывали швы, как описано в примере 1, и оставляли для восстановления. 5 крыс на одну временную точку умерщвляли через 30, 60, 90, 120, 150, 180 и 365 дней после инъекции аденовируса, как описано в примере 1 выше. Хвостовые доли печени затем собирали и подготавливали для анализа активности люциферазы, как описано в примере 1.

Результаты приведены на фиг. 5. На 30 день в экстрактах хвостовой доли в среднем обнаружили приблизительно  $10^5$  ОСЕ/г белка. Активность люциферазы увеличилась больше чем в 100 раз между 30 и 90 днями после введения аденовируса (с  $\sim 10^3$  ОСЕ/г белка до  $\sim 10^5$  ОСЕ/г белка). На 120 день после аденовирусной трансдукции экспрессия белка снизилась примерно до половины от наблюдаемой экспрессии на 30 день после трансдукции ( $\sim 500$  ОСЕ/г белка). Экспрессия затем обратно увеличилась до более чем  $10^4$  ОСЕ/г белка на 150 день после трансдукции. Этот уровень экспрессии белка поддерживался на протяжении 180 дней после инъекции и лишь незначительно снизился через 1 год (365 дней) после аденовирусной трансдукции. Эти результаты демонстрируют устойчивую экспрессию трансгена на протяжении по меньшей мере 1 года после трансдукции.

Пример 5. Экспрессия мРНК цитокина.

Были определены уровни экспрессии цитокинов, индуцированной в печени при доставке аденовируса в компартментализованную хвостовую долю, и уровни экспрессии цитокинов, индуцированной в периферической крови при доставке аденовируса в полую вену. Кратко, после того как хвостовая доля была зажата, была проведена хирургическая операция, описанная в примере 1, с последующей инъекцией в паренхиму хвостовой доли  $1 \times 10^9$  БОЕ рекомбинантного Ad.CMV.Luc в 50 мкл фосфатно-солевого буфера (PBS), как описано в примере 1. В качестве контрольной группы животным в полую вену инъецировали  $1 \times 10^9$  БОЕ Ad.CMV.Luc в общем объеме 50 мкл PBS, как описано в примере 1.

Через 72 ч после операции крыс умерщвляли внутрибрюшинной дозой пентобарбитала натрия. Печень собирали, разделяли хвостовую долю, правую латеральную, левую латеральную и среднюю доли печени. Тотальную РНК экстрагировали с помощью набора Trizol kit (Gibco/Life Technologies), следуя протоколу производителя. 1 мкг тотальной РНК использовали для обратной транскрипции, которую проводили, используя набор RNA PCR Kit (Applied Biosystems, Branchburg NJ), следуя инструкциям производителя. Для обнаружения мРНК фактора некроза опухоли альфа ( $TNF\alpha$ ), использовали следующие праймеры: смысловой 5'-ACTCCAGAAAAGCAAGCAA-3' (SEQ ID NO:3) и антисмысловой 5'-CGAGCAGGAATGAGAAGAGG-3' (SEQ ID NO:4) в общем реакционном объеме 20 мкл. Условия ПЦР были следующие: 94°C в течение 5 мин, далее 25 циклов при 94°C в течение 30 с, 58°C в течение 30 с и 72°C в течение 30 с, и 7 мин при 72°C для удлинения. Для трансформирующего фактора роста бета ( $TGF\beta$ ) использовали следующие праймеры: смысловой 5'-ATACGCCTGAGTGGCTGTCT-3' (SEQ ID NO:5) и антисмысловой 5'-TGGGACTGATCCCATGATT-3' (SEQ ID NO:6) в общем реакционном объеме 20 мкл. Условия ПЦР были следующие: 94°C в течение 5 мин, далее 25 циклов при 94°C в течение 30 с, 58°C в течение 30 с и 72°C в течение 30 с, и 7 мин при 72°C для удлинения. Для интерферона гамма ( $IFN\gamma$ ) использовали следующие праймеры: смысловой 5'-GCCCTCTGGCTGTACTTG-3' (SEQ ID NO:7) и антисмысловой 5'-CTGATGGCCTGGTGTCTTT-3' (SEQ ID NO:8) в общем реакционном объеме 20 мкл. Условия ПЦР были следующие: 94°C в течение 5 мин, далее 25 циклов при 94°C в течение 30 с, 60°C в течение 30 с и 72°C в течение 30 с, и 7 мин при 72°C для удлинения. Для интерлейкина 6 ( $IL-6$ ) использовали следующие праймеры: смысловой 5'-CCGAGAGGAGACTTACACAG-3' (SEQ ID NO:9) и антисмысловой 5'-ACAGTGCATCATCGCTGTTC-3' (SEQ ID NO:10) в общем реакционном объеме 20 мкл. Условия ПЦР были следующие: 94°C в течение 5 мин, далее 25 циклов при 94°C в течение 30 с, 55°C в течение 30 с и 72°C в течение 30 с, и 7 мин при 72°C для удлинения. В качестве внутреннего контроля ПЦР использовали следующие праймеры для бета-актина: смысловой 5'TGAAGATCAAGATCATTTGCTCCTCC-3' (SEQ ID NO:11) и антисмысловой 5'-CTAGAAGCATTTGCGGTGGACGATG-3' (SEQ ID NO:12) в общем реакционном объеме 20 мкл. Условия ПЦР были следующие: 94°C в течение 5 мин, далее 25 циклов при 94°C в течение 30 с, 55°C в течение 30

с, и 72°C в течение 30 с, и 7 мин при 72°C для удлинения.

Результаты изображены на фиг. 6. Результаты показывают, что доставка аденовируса в полую вену приводит к обнаружению TNF $\alpha$  и IFN $\gamma$  во всех долях печени, тогда как TGF $\beta$  и IL-6 были обнаружены во всех долях печени, за исключением правой латеральной доли. В противоположность этому, доставка аденовируса в компартментализованную хвостовую долю приводит к обнаружению TGF $\beta$  и IFN $\gamma$  в хвостовой доле и к экспрессии TNF $\alpha$  на низком уровне в хвостовой доле. Экспрессия этих цитокинов в других долях не была обнаружена. IL-6 не был обнаружен ни в одной доле. Таким образом, результаты демонстрируют низкую экспрессию цитокинов в печени.

Пример 6. Исследования наложения зажима *ex vivo* на трупную печень свиньи.

Предварительные исследования *ex vivo* были проведены на печени свиней. Свинья была выбрана в качестве модели по причине того, что размер, масса и макроскопическая анатомия животного очень сходны с человеком. Свежую целую/полную печень получали с местной скотобойни. Используя лапароскопическое устройство, на левую среднюю долю накладывали зажим и в паренхиму инъецировали 5 мл бромфенолового синего. Через 30 мин зажим снимали и ткань с двух сторон от места наложения зажима вырезали и анализировали наличие в ней синего красителя. В то время как синий краситель обнаруживали на границе наложения зажима со стороны ткани, проксимальной месту инъекции, синий краситель не проникал в ткань с края границы наложения зажима, который находился дистальнее места инъекции. Таким образом, зажимное устройство могло компартментализовать краситель, предотвращая перенос раствора на дистальную сторону устройства.

Пример 7. Компартментализация трансдукции аденовируса в свиньях.

Процедуру, описанную в примере 1, далее тестировали на свиньях, используя зажимное устройство, описанное в примере 6. Свиней содержали в стандартных условиях с 12 ч циклом день/ночь и обеспечивали водой и пищей *ad libitum*. Свиней подвергали общей анестезии и после асептической обработки брюшной зоны делали 5 см срединный разрез под мечевидным отростком. Определяли расположение левой средней доли печени и обнажали ее, после чего хирургический зажим, описанный в примере 5, накладывали на дистальную часть левой средней доли. В изолированную паренхиму левой средней доли затем инъецировали 500 мкл фосфатно-солевого буферного раствора (PBS), содержащего  $1 \times 10^9$  инфекционных вирусных частиц гAd-CMV-Luciferase, используя шприц для инсулина.

Через 30 мин после наложения зажима зажим удаляли, на брюшную полость накладывали швы в двух плоскостях, и оставляли животных для восстановления. Через 72 ч после операции животных умерщвляли и собирали печень. Образцы ткани брали из места инъекции, а также из левой латеральной доли, правой латеральной доли и правой средней доли из мест, которые являются проксимальными, медиальными и дистальными относительно места инъекции. Образцы ткани замораживали для использования для анализа активности люциферазы и проведения вложенной полимеразной цепной реакции (ПЦР) вирусной ДНК.

Компартментализацию аденовирусной трансдукции оценивали в образцах ткани. Кратко, образцы ткани гомогенизировали и проводили анализ активности люциферазы, как описано в примере 1. Результаты приведены на фиг. 7. Фооновую активность люциферазы наблюдали для долей из всех образцов из правой латеральной, правой средней и левой латеральной долей. В противоположность этому, активность люциферазы, измеренная в месте инъекции, была приблизительно в 20 раз выше, чем в любом другом образце. Эти результаты демонстрируют, что активность люциферазы была ограничена тканью, на которую был наложен зажим и в которую была осуществлена инъекция, и подтверждают вывод о том, что аденовирусная трансдукция в свиньях была компартментализована.

Для подтверждения компартментализации трансдукции аденовируса образцы ткани далее анализировали с помощью вложенной ПЦР. Первую реакцию ПЦР проводили, амплифицируя ген Luciferase на протяжении 50 циклов с использованием специфичных праймеров. В качестве положительного контроля использовали 10 мкл аденовируса Ad.CMV.Luc и в качестве отрицательного контроля использовали плазмиду pcDNA3 (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA). Первый продукт анализировали с помощью электрофореза в агарозном геле. Результаты показали полосу, амплифицированную из ткани, в которую был инъецирован аденовирус, аналогичную по размеру той, которая наблюдается в положительном контроле, но данная полоса отсутствовала в любых других образцах ткани или в образце отрицательного контроля. Вторую реакцию ПЦР с использованием первого ПЦР продукта и вложенных праймеров проводили со смысловым праймером 5'-CAACTGCATAAGGCTATGAAGAGA-3' (SEQ ID NO:13) и антисмысловым праймером 5'-ATTTGTATTTCAGCCCATATCGTTT-3' (SEQ ID NO:14) в общем реакционном объеме 20 мкл. Условия ПЦР были следующие: 94°C в течение 5 мин, далее 25 циклов при 94°C в течение 30 с, 53°C в течение 30 с и 72°C в течение 30 с, и 7 мин при 72°C для удлинения. При анализе с помощью электрофореза в агарозном геле четкая полоса, соответствующая гену Luciferase, присутствовала в образцах ткани, в которую была осуществлена инъекция, и в положительном контроле, но данная полоса полностью отсутствовала в образцах других тканей и отрицательном контроле. Наличие последовательности вирусной ДНК в ткани, на которую был наложен зажим и в которую была осуществлена инъекция, и отсутствие в любой соседней ткани свидетельствует об успешной компартментализации вирусной

трансдукции.

Пример 8. Экспрессия растворимого репортерного белка в крови после доставки в компартиментализованную долю печени.

Для определения того, может ли растворимый белок быть экспрессирован и обнаружен в крови, аденовирус, экспрессирующий растворимый белок, инъецировали в хвостовую долю крыс, которая была компартиментализована с помощью зажима на паренхиму. Аденовирус, обозначенный как Ad-ALB-AFP, был получен из аденовируса типа 5 человека, и кодировал альфа-фетопротеин (AFP) крысы под контролем последовательности промотора альбумина крысы (Herbomel et al. (1989) *Molecular and Cellular Biology*, 9:4750-4758; Tronche et al. (1989) *Molecular and Cellular Biology*, 9:4759-4766). Был создан дефектный по репликации аденовирус путем делеции района E1. В этот делетированный район E1 клонировали репортерный ген альфа-фетопротеина (AFP), сконструированный таким образом, чтобы он находился под контролем промотора альбумина (ALB) крысы для специфичности по отношению к печени. Плазмиду pUC57, кодирующую AFP крысы под контролем промотора ALB, синтезировали с помощью Genscript (Piscataway, NJ). Кассету экспрессии AFP из плазмиды pUC57 субклонировали в аденовирусный челночный вектор Dual-Basic и рекомбинировали с вектором Ad5 (DE1/DE3) (Vector Biolabs, Philadelphia, PA). Аденовирус упаковывали в клетках HEK293 и очищали с помощью ультрацентрифугирования в градиенте плотности хлорида цезия. Вводили  $3,25 \times 10^9$  вируса ALB-AFP в общем объеме 50 мкл. На 5 день после инъекции животных умерщвляли и собирали печень.

Компартиментализацию проводили аналогично процедурам, описанным в примере 1. Кратко, 8 крыс анестезировали внутрибрюшинной (IP) инъекцией 60 мг/кг кетамина-HCl и ксилазина-HCl (Baxter Healthcare Corporation, Deerfield, IL). Каждую крысу затем помещали в положение лежа на спине, выбривали брюшную область и делали 3 см вентральный срединный разрез брюшной полости от мечевидного отростка к пупочной области. Определяли расположение верхней части хвостовой доли и вырезали ее, отделив междольчатые и печеночно-желудочную связки. Идентифицировали сосудистую ножку хвостовой доли и зажимали ее с помощью 10-мм микрососудистого зажима (Fine Science Tools -USA Inc., Foster City, CA).

После того как хвостовая доля была зажата, в паренхиму хвостовой доли 6 крыс инъецировали  $3,75 \times 10^9$  БОЕ рекомбинантного Ad.ALB-AFP в 50 мкл фосфатно-солевого буфера (PBS) в 1-мл шприце (Becton Dickinson Corp., Franklin, NJ). Другим 2 крысам не делали инъекций и использовали их в качестве контроля. Зажим оставляли на 30 мин. Крысам далее накладывали швы в двух плоскостях (мышцы и кожа) с помощью 5-0 Викрила (Ethicon, Inc., Somerville, NJ) и оставляли до восстановления.

Через 7 дней после операции 1 мл периферической крови забирали из полых вен. Кровь забирали, используя пробирку для отделения сыворотки (Becton Dickinson Corp., Franklin, NJ) и образцы оставляли для свертывания на 30 мин перед центрифугированием при 1000 g в течение 15 мин. Сыворотку отбирали, разделяли на аликвоты и хранили образцы при  $-20^{\circ}\text{C}$ . AFP обнаруживали в сыворотке с помощью набора для альфа-фетопротеина крысы AFP ELISA Kit (Cusabio Biotech Co., Ltd., Wuhan China), следуя протоколу производителя.

Результаты изображены на фиг. 8. Результаты демонстрируют обнаружение AFP в крови контрольных крыс, которым не делали инъекцию вируса. Результаты демонстрируют, что у крыс, которым сделали инъекцию Ad.ALB-AFP, уровень AFP в сыворотке крови был выше, чем у контрольных животных. Таким образом, результаты демонстрируют, что инъекция в компартиментализованную долю печени аденовируса, экспрессирующего растворимый белок, приводит к экспрессии растворимого белка, который обнаруживается в крови.

Поскольку некоторые модификации будут очевидны специалистам в данной области техники, предполагается, что это изобретение ограничено только объемом прилагаемой формулы изобретения.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ доставки агента, представляющего собой молекулу нуклеиновой кислоты, субъекту, включающий:

а) компартиментализацию ткани, органа или их части с целью изоляции от системного кровообращения субъекта, где часть имеет объем по меньшей мере  $5 \text{ мм}^3$ ;

б) введение доставляемого агента непосредственно в паренхиму компартиментализованной ткани, органа или их части, причем указанное введение не производят в соединительную ткань, кровеносные сосуды, нервы или протоки;

в) поддержание компартиментализации в течение заранее установленного времени для осуществления поглощения доставляемого агента клетками паренхимы, где указанное время составляет по меньшей мере 15 мин; и

г) восстановление связи между тканью, органом или их частью и системным кровообращением спустя время, заранее установленное для поглощения доставляемого агента клетками.

2. Способ по п. 1, где ткань или орган представляет собой печень или часть печени.

3. Способ по п. 1 или 2, где время составляет по меньшей мере 20 мин.

4. Способ по п.1 или 2, где время составляет по меньшей мере 30 мин.
5. Способ по любому из пп.1-4, где время составляет вплоть до 60 мин.
6. Способ по любому из пп.1-5, где компартиментализацию ткани, органа или их части проводят до введения доставляемого агента или одновременно с введением доставляемого агента.
7. Способ по п.6, где компартиментализацию ткани, органа или их части проводят до введения доставляемого агента.
8. Способ по любому из пп.1-7, где компартиментализацию проводят путем зажима органа, ткани или их части с тем, чтобы блокировать артерии, вены, протоки и/или сосуды в ткани, органе или в их части, посредством чего в них устраняются кровоснабжение и поток крови.
9. Способ по п.8, где все артерии, вены, протоки и/или сосуды, обслуживающие или проходящие через орган, ткань или их часть, заблокированы от коммуникации с паренхимой компартиментализованного органа, ткани или их части.
10. Способ по п.9, где блокирование артерий, вен, протоков и/или сосудов осуществляют с помощью устройства или метода, выбранного из ручной компрессии, артериального или венозного зажима, окклюзионного катетера, сшивающего устройства, бандажа, жгута и кабеля.
11. Способ по любому из пп.8-10, где зажим представляет собой лапароскопический зажим.
12. Способ по любому из пп.1-11, где после компартиментализации ткани, или органа, или их части способ дополнительно включает применение отсоса для уменьшения количества или устранения крови в ткани, или органе, или их части.
13. Способ по п.1, где восстановление связи с системным кровообращением включает удаление устройства или прекращение использования методики, которые применяли для компартиментализации ткани, органа или их части.
14. Способ по любому из пп.1-13, где часть ткани или органа является компартиментализованной.
15. Способ по любому из пп.1-13, где ткань, орган или их часть представляют собой долю печени или ее часть.
16. Способ по любому из пп.1-15, где доставляемый агент выбран из невирусного вектора, вируса, вирусоподобной частицы, миникольца, наночастицы и целой клетки, которые включают молекулу нуклеиновой кислоты.
17. Способ по п.16, где наночастица представляет собой наночастицу направленного действия или радиоактивно меченную наночастицу.
18. Способ по п.16, где вирус выбран из аденовируса, аденоассоциированного вируса (AAV), ретровируса, вируса осповакцины и вируса простого герпеса.
19. Способ по п.18, где вирус является ретровирусом.
20. Способ по п.19, где ретровирус представляет собой лентивирус.
21. Способ по п.18, где вирус представляет собой аденоассоциированный вирус (AAV).
22. Способ по п.18, где вирус представляет собой аденовирус.
23. Способ по п.22, где аденовирус содержит делецию в кодирующем участке E1, E2a, E2b, E3 и/или E4.
24. Способ по п.22 или 23, где серотип представляет собой аденовирус типа 2 или аденовирус типа 5.
25. Способ по любому из пп.18-24, где вирус содержит молекулу нуклеиновой кислоты, которая гетерологична по отношению к геному вируса.
26. Способ по любому из пп.1-25, где молекула нуклеиновой кислоты кодирует полипептид.
27. Способ по п.26, где полипептид выбран из фермента, гормона, фактора коагуляции или свертывания, цитокина, фактора роста или их активных частей, антитела или связывающих антиген частей антител, модулятора ангиогенеза, иммуномодулятора, модулятора боли, рецептора или его активной части, транспортного белка, регуляторного белка, антигена и аллергена.
28. Способ по п.27, где полипептид выбран из аденозиндезаминазы, трансмембранного регулятора проводимости при муковисцидозе (CTFR), галсульфазы, ларонидазы, N-ацетилгалактозамин 6-сульфатазы, фенилаланин-аммиак лиазы, кислой альфа-глюкозидазы, имиглуцеразы, алглюкозидазы альфа, тиреотропина, гормона роста, инсулина, тироидного гормона, эритропоэтина (EPO), интерлейкина-1 (IL-1), IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-7, интерферона- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ), IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , фактора некроза опухоли (TNF), IL-12, IL-18, fms-подобной тирозинкиназы 3 (flt3), нейропилина-2 (NP2), костных морфогенетических белков (BMP), эпидермального фактора роста (EGF), фактора роста фибробластов (FGF), гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (G-CSF), гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF), фактора роста гепатоцитов (HGF), инсулиноподобного фактора роста (IGF), тромбоцитарного фактора роста (PDGF), трансформирующего фактора роста  $\alpha$  или  $\beta$ , фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), рецептора фактора роста фибробластов (FGFR), антагониста FGFR (sFGFR), рецептора трансформирующего фактора роста (TGFR), рецептора фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR), активатора плазминогена, урокиназы, фактора VIII, фактора IX, фактора фон Виллебранда, металлопротеиназы с тромбоспондиновым мотивом

1 (METH-1), METH-2, фрагментов триптофанил-тРНК синтетазы (TrpRS), белка, родственного пролиферину, фрагмента пролактина, фактора пигментного эпителия (PEDF), вазостатина, ангиостатина, эндостатина, кининостатина, фрагмента фибриногена-E, тромбоспондина, тумстатина, канстатина, рестина, растворимой fms-подобной тирозинкиназы-1 (sFlt-1), растворимых рецепторов фактора роста эндотелия сосудов (sFlk), растворимого нейропилина 1 (sNRP1), индуцируемого интерфероном гамма белка 10 (IP-10), тромбоцитарного фактора 4 (PF-4), Gro-бета, растворимого рецептора эфрина типа В (4sEphB4), растворимого эфрина В2, IGF-1, тимидинкиназы вируса простого герпеса (HSV-TK), карбоксипептидазы G2 (CPG2), карбоксилэстеразы (CA), цитозиндезаминазы (CD), цитохрома P450 (cyt-450), дезоксицитидинкиназы (dCK), нитроредуктазы (NR), пурин-нуклеозид-фосфорилазы (PNP), тимидинфосфорилазы (TP), тимидинкиназы вируса ветряной оспы (VZV-TK), ксантин-гуанинфосфорибозилтрансферазы (XGPRT), аспартилглюкозаминидазы,  $\alpha$ -галактозидазы А, тиоэстеразы пальмитоилированных белков, трипептидил пептидазы, лизосомного трансмембранного белка, транспортера цистеина, кислой церамидазы, кислой  $\alpha$ -L-фукозидазы, защитного белка/катепсина А, кислой  $\beta$ -глюкозидазы или глюкоцереброзидазы, кислой  $\beta$ -галактозидазы, идуронат-2-сульфатазы,  $\alpha$ -L-идуронидазы, галактоцереброзидазы, кислой  $\alpha$ -маннозидазы, кислой  $\beta$ -маннозидазы, арилсульфатазы В, арилсульфатазы А, N-ацетилгалактозамин-6-сульфат сульфатазы, N-ацетилглюкозамин-1-фосфотрансферазы, кислой сфингомиелиназы, NPC-1,  $\beta$ -гексозаминидазы В, гепаран N-сульфатазы,  $\alpha$ -N-ацетилглюкозаминидазы (NaGlu), ацетил-CoA: $\alpha$ -глюкозаминид N-ацетилтрансферазы, N-ацетилглюкозамин-6-сульфат сульфатазы,  $\beta$ -глюкуронидазы, кислой липазы, неприлизина, деградирующего инсулин фермента инсулизына, тимет олигопептидазы, кальбиндина D28, парвальбумина, HIF1-альфа, SIRT-2, SMN-1, SMN-2, GDNF, цилиарного нейротрофического фактора (CNF), рецептора липопротеина низкой плотности (LDLR), липопротеин липазы (LPL), альфа-1-антитрипсина (ААТ), УДФ-глюкурозилтрансферазы (UGT), UGT1A1, глюкоза-6 фосфатазы, фосфоенолпируваткарбоксикиназы, галактоза-1-фосфат уридил трансферазы, фенилаланин гидроксилазы, дегидрогеназы разветвленной альфа-кетокислоты, фумарилацетоацетат гидролазы, метилмалонил-CoA мутаза, орнитинтранскарбамилазы, синтетазы аргинин-янтарной кислоты, гипоксантингуанинфосфорибозилтрансферазы, биотинидазы, бета-глюкоцереброзидазы, порфобилиногендезаминазы (PBDG) и р53.

29. Способ по п.26, где молекула нуклеиновой кислоты представляет собой молекулу терапевтической нуклеиновой кислоты, которая кодирует терапевтически активный белок.

30. Способ по п.29, где указанный белок пригоден для лечения заболеваний или состояний, выбранных из артрита, хронической боли, вызванного ВИЧ СПИДа, атеросклероза, рестеноза, наследственного дефицита ферментов, наследственного иммунодефицита, рака, ретровирусной инфекции, гемофилии, диабета, мышечной дистрофии, сердечно-сосудистых расстройств, кистозного фиброза, нейродегенеративных расстройств, травм, боли, серповидно-клеточной анемии, аутоиммунного заболевания, воспалительного заболевания и гипертонии.

31. Способ по п.29, где молекула нуклеиновой кислоты кодирует белок, выбранный из фактора VIII для лечения гемофилии А; фактора IX для лечения гемофилии В; гена инсулина для лечения сахарного диабета типа I; альфа-1-антитрипсина для лечения дефицита альфа-1-антитрипсина (ААТ); белка гемохроматоза (HFE) для лечения гемохроматоза; транспортирующей медь АТФазы 2 для лечения болезни Вильсона; УДФ-глюкуронозилтрансферазы 1A1 (UGT1A1) для лечения синдрома Криглера-Найяра типа I; орнитинтранскарбамилазы (ОТС) для лечения дефицита орнитинтранскарбамилазы типа II; рецептора липопротеинов низкой плотности (LDLR) для лечения семейной гиперхолестеринемии; фибриногена альфа (FGA), бета (FGB) или гамма (FGG) для лечения афибриногенемии; глюкозы-6-фосфатазы- $\alpha$  для лечения заболевания накопления гликогена (GSD) типа Ia; G6PT для лечения GSD типа Ib; кислой- $\alpha$ -глюкозидазы для лечения GSD типа II (Помпе);  $\alpha$ -L-идуронидазы для лечения мукополисахаридоза (MPS1); сульфамидазы для лечения MPS IIIA;  $\alpha$ -N-ацетилглюкозаминидазы (NaGlu) для лечения MPS IIIB;  $\beta$ -глюкуронидазы для лечения MPS VII;  $\alpha$ -галактозидазы А для лечения болезни Фабри; глюкоцереброзидазы для лечения болезни Гаучера; кислой сфингомиелиназы для лечения синдрома Ниманна-Пика; фенилаланин гидроксилазы для лечения фенилкетонурии; антагониста ТИМР или молекул анти-HSC для лечения фиброза печени; молекул анти-ROS для лечения ишемически-реперфузионного повреждения печени; деградирующего амилоид-бета фермента неприлизина, деградирующего инсулин фермента инсулизына или тимет олигопептидазы для лечения болезни Альцгеймера; инсулиноподобного фактора роста-1 (IGF-1), кальбиндина D28, парвальбумина, HIF1-альфа, SIRT-2, VEGF, SMN-1, SMN-2, GDNF или цилиарного нейротрофического фактора (CNF) для лечения бокового амиотрофического склероза (ALS); галактоза-1 фосфат уридил трансферазы для лечения галактоземии; дегидрогеназы разветвленных альфа-кетокислот для лечения заболевания мочи с запахом кленового сиропа; фумарилацетоацетат гидролазы для лечения тирозинемии типа I; метилмалонил-CoA мутаза для лечения метилмалоновой ацидемии; синтетазы аргинин-янтарной кислоты для лечения цитруллинемии; гипоксантингуанин-фосфорибозилтрансферазы для лечения подагры и синдрома Леша-Нихена; бета-глюкуронидазы для лечения синдрома Слая; 70 кДа белка мембраны пероксисомы для лечения синдрома Цельвегера, энфувиртида для лечения инфекции вирусом иммунодефицита человека (HIV); аденозиндезаминазы (ADA)

для лечения комбинированного иммунодефицита (SCID); CFTR для лечения муковисцидоза; порфобилиногендезаминазы (PBDG) для лечения острой интермиттирующей порфирии; интерферона бета для лечения рассеянного склероза; липопротеинлипазы для лечения дефицита липопротеинлипазы (LPLD), p53 для лечения рака; декарбоксилазы глутаминовой кислоты (GAD) для лечения болезни Паркинсона.

32. Способ по п.26, где полипептид повышает образование мышц у животного, повышает образование волос у животного, повышает образование шерсти у животного, усиливает рост животного или вовлечен в синтез или использование питательных веществ.

33. Способ по п.32, где полипептид, повышающий образование мышц у животного, представляет собой ингибитор миостатина;

полипептид, усиливающий рост животного, представляет собой гормон роста, IGF-1, рилизинг фактор гормона роста или Ski курицы и

полипептид, вовлеченный в синтез или использование питательных веществ, представляет собой серин трансацетилазу и О-ацетилсерин сульфгидрилазу.

34. Способ по п.33, где ингибитор миостатина представляет собой фоллистатин.

35. Способ по любому из пп.1-25, где молекула нуклеиновой кислоты выбрана из молекулы ДНК, молекулы РНК и аптамера.

36. Способ по п.35, где молекула нуклеиновой кислоты выбрана из микроРНК, малой интерферирующей РНК, рибозима и антисмысловой РНК.

37. Способ по любому из пп.1-36, включающий получение изображения ткани или органа для идентификации паренхимной ткани до введения доставляемого агента.

38. Способ по любому из пп.1-37, где доставляемый агент вводят в состав композиции с липидами, полимерными реагентами или другими агентами для облегчения проникновения в клетки паренхимы.

39. Способ по любому из пп.1-38, где указанный агент доставляют в паренхиму при использовании физического способа, облегчающего проникновение в ее клетки.

40. Способ по п.39, где физический способ выбран из электропорации, сонопорации, гидродинамического давления, ультразвука и генной пушки.

41. Способ по любому из пп.18-40, где указанный агент представляет собой аденовирус или аденоассоциированный вирус, содержащий гетерологичную молекулу нуклеиновой кислоты в геноме; и количество вирусных частиц доставляемого агента составляет между примерно 10 и  $1 \times 10^{12}$ .

42. Способ по любому из пп.1-41, где субъект выбран из мыши, крысы, коровы, свиньи, овцы, козы, лошади и человека.

43. Способ по п.42, где субъект представляет собой ребенка, возраст которого менее 18 лет, или представляет собой человеческий плод.

44. Способ по п.42, где субъектом является человек.

45. Способ по любому из пп.1-44, где у субъекта была диагностирована генетическая недостаточность.

46. Способ по любому из пп.1-45, который осуществляют с помощью лапароскопии.

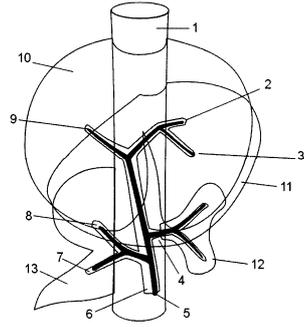
47. Способ по любому из пп.1-46, включающий:

а) компартиментализацию ткани, органа или их части с целью изоляции от системного кровообращения субъекта, где часть имеет объем по меньшей мере  $5 \text{ мм}^3$  и компартиментализацию проводят путем зажима;

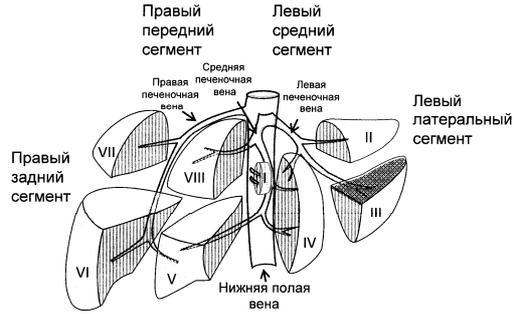
б) введение агента непосредственно в паренхиму компартиментализованной ткани, органа или их части, где агент содержит молекулу нуклеиновой кислоты, агент напрямую проникает в клетки паренхимы компартиментализованной ткани, органа или их части;

в) поддержание компартиментализации в течение времени, заранее установленного для поглощения доставляемого агента клетками паренхимы, где указанное время составляет по меньшей мере 30 мин; и

г) восстановление связи ткани, органа или их части с системным кровообращением через время, заранее установленное для поглощения доставленного агента клетками.



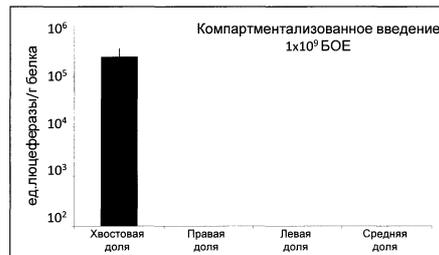
Фиг. 1А



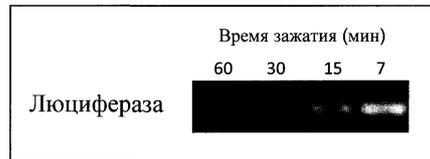
Фиг. 1В



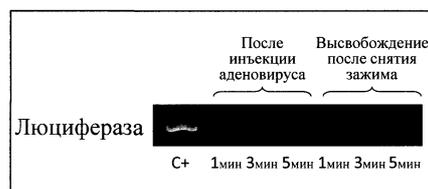
Фиг. 2А



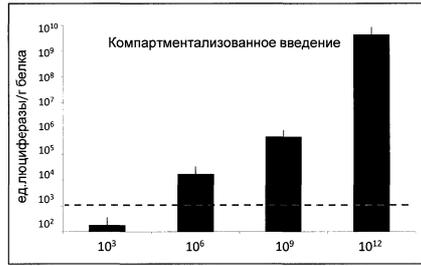
Фиг. 2В



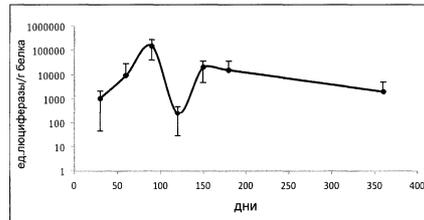
Фиг. 3А



Фиг. 3В



Фиг. 4

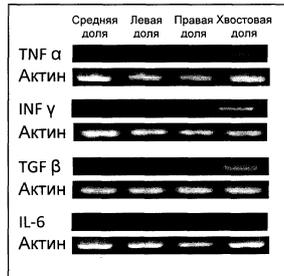


Фиг. 5

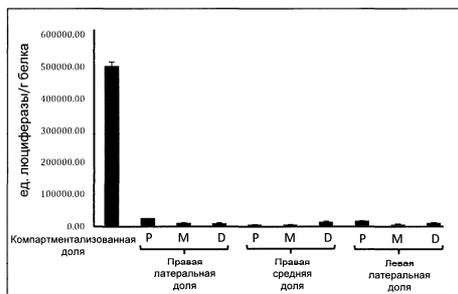
Внутривенное введение



Компартментализованное введение

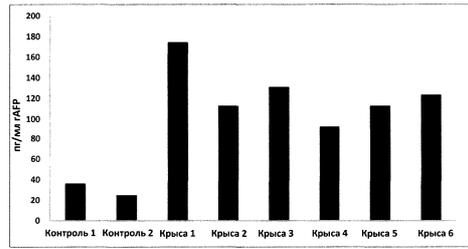


Фиг. 6



P – проксимально по отношению к месту инъекции  
 M – медиально по отношению к месту инъекции  
 D – дистально по отношению к месту инъекции

Фиг. 7



Фиг. 8