

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **034355**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.01.30

(21) Номер заявки
201692206

(22) Дата подачи заявки
2015.05.02

(51) Int. Cl. **C07K 14/71** (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
C07K 14/015 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)

(54) ВЕКТОРЫ НА ОСНОВЕ AAV ДЛЯ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ В СЕТЧАТКЕ И CNS

(31) **61/988,131; 62/114,575**

(32) **2014.05.02; 2015.02.10**

(33) **US**

(43) **2017.03.31**

(86) **PCT/US2015/028966**

(87) **WO 2015/168666 2015.11.05**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ДЖЕНЗИМ КОРПОРЕЙШН (US)

(72) Изобретатель:
**Скарни Абрахам, Салливан
Дженнифер, Стенек Лайза М. (US)**

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

(56) ALLOCCA MARIACARMELA ET AL.: "Novel adeno-associated virus serotypes efficiently transduce murine Photoreceptors", JOURNAL OF VIROLOGY, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 81, no. 20, October 2007 (2007-10), pages 11372-11380, XP002528463, ISSN: 0022-538X, DOI: 10.1128/JVI.01327-07, p. 11372-11379

VANDENBERGHE LUK H. ET AL.: "Heparin binding directs activation of T cells against adeno-associated virus serotype 2 capsid", NATURE MEDICINE, NATURE PUBLISHING GROUP, NEW YORK, NY, US, vol. 12, no. 8, August 2006 (2006-08), pages 967-971, XP002454221, ISSN: 1078-8956, DOI: 10.1038/NM1445, table 1
WO-A2-2013173129
EP-A1-1486567
WO-A2-2010093784

(57) В данном документе предусмотрены улучшенные гAAV (например, гAAV2, гAAVrh8R и т.д.) для повышения качества генной терапии глазных нарушений или нарушений со стороны CNS, где гAAV содержат одну или несколько замен аминокислот, которые взаимодействуют с гепарансульфатсодержащим протеогликаном. В настоящем изобретении предусмотрены способы улучшенной трансдукции клеток сетчатки и способы лечения заболеваний глаз с помощью улучшенных композиций на основе частиц гAAV. В данном документе дополнительно предусмотрен улучшенный рекомбинантный аденоассоциированный вирус (гAAV) (например, гAAV2, гAAVrh8R и т.д.) для повышения качества генной терапии нарушений со стороны CNS. В настоящем изобретении предусмотрены способы доставки гAAV в CNS, способы лечения нарушений со стороны CNS с помощью улучшенных композиций на основе частиц гAAV и наборы для доставки гAAV в CNS и/или лечения нарушения со стороны CNS.

B1**034355****034355 B1**

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Заявка на настоящий патент заявляет преимущество приоритета по предварительной заявке на патент США с регистрационным № 61/988131, поданной 2 мая 2014 г., и предварительной заявке на патент США с регистрационным № 62/114575, поданной 10 февраля 2015 г., каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Представление перечня последовательностей в текстовом файле ASCII

Содержание нижеследующего представленного текстового файла ASCII включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте: машиночитаемая форма (CRF) перечня последовательностей (название файла: 159792010440SEQLIST.txt, дата составления: 29 апреля 2015 г., размер: 85 кБ).

Область техники, к которой относится настоящее изобретение

Настоящее изобретение относится к вариантам векторов на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV) для улучшенной доставки в глаз и CNS; например, для улучшенной генной терапии в сетчатке и улучшенной генной терапии в CNS.

Краткое описание настоящего изобретения

Дегенеративные заболевания сетчатки являются перспективным предметом направленности генной терапии, опосредованной вектором на основе аденоассоциированного вируса (AAV). Векторы на основе AAV могут опосредовать длительную экспрессию генов в сетчатке и вызывать минимальные иммунные ответы, что делает эти векторы привлекательным выбором для доставки генов в глаз. Сетчатка является светочувствительной тканью в задней части глаза, которая состоит из различных типов клеток, включая фоторецепторные клетки, клетки пигментного эпителия сетчатки и ганглионарные клетки сетчатки. Тип клеток-мишеней и путь векторной доставки для вектора на основе AAV для генной терапии будут зависеть от показаний при заболевании. Например, в клиническом испытании фазы I для возрастной макулярной дегенерации используется интравитреальная доставка вектора для осуществления трансдукции ганглионарных клеток сетчатки, а в недавнем клиническом испытании при лечении пациентов с врожденным амаврозом Лебера 2 типа, формой пигментной дистрофии сетчатки, применяется субретинальная доставка гена RPE65 для трансдукции клеток пигментного эпителия сетчатки.

С учетом такой полезности существует необходимость в разработке новых средств и способов для улучшения доставки AAV в глаз.

Векторы на основе аденоассоциированного вируса (AAV) также стали предпочтительной векторной системой для неврологической генной терапии с превосходными показателями безопасности, зарегистрированной в нескольких клинических испытаниях (Kaplit, M.G. et al. (2007) Lancet 369:2097-2105; Eberling, J.L. et al. (2008) Neurology 70:1980-1983; Fiandaca, M.S. et al. (2009) Neuroimage. 47 Suppl 2:T27-35). Однако эффективное лечение неврологических нарушений было в значительной степени затруднено проблемами, связанными с доставкой векторов на основе AAV в пораженные популяции клеток. Этот вопрос доставки был особенно проблематичным для нарушений, охватывающих центральную нервную систему (CNS). Соответственно, существует дополнительная необходимость в повышении качества доставки AAV в CNS.

В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает способы доставки гетерологичной нуклеиновой кислоты в глаз индивидуума, включающие введение частицы рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV) в субретинальную область индивидуума, где частица rAAV содержит а) капсид rAAV, содержащий капсидные белки rAAV, содержащие одну или несколько аминокислотных замен в одном или нескольких положениях, в которых происходит взаимодействие с гепарансульфатсодержащим протеогликаном, или в одном или нескольких положениях, соответствующих аминокислотам 484, 487, 527, 532, 585 или 588, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAV2, и б) вектор на основе rAAV, содержащий гетерологичную нуклеиновую кислоту и по меньшей мере один инвертированный концевой повтор AAV. В некоторых вариантах осуществления частица rAAV содержит капсид AAV серотипа 2 (AAV2). В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен ослабляют связывание частицы rAAV с гепарансульфатсодержащим протеогликаном. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен ослабляют связывание частицы rAAV с гепарансульфатсодержащим протеогликаном приблизительно по меньшей мере на 10%, приблизительно по меньшей мере на 25%, приблизительно по меньшей мере на 50%, приблизительно по меньшей мере на 75% или приблизительно по меньшей мере на 100%. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен повышают эффективность трансдукции клетки в глазу или CNS частицей rAAV. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен повышают эффективность трансдукции клетки в глазу или CNS частицей rAAV приблизительно по меньшей мере на 10%, приблизительно по меньшей мере на 25%, приблизительно по меньшей мере на 50%, приблизительно по меньшей мере на 75% или приблизительно по меньшей мере на 100%, например, по сравнению с эталонным капсидом rAAV, содержащим капсидный белок AAV дикого типа. В некоторых вариантах осуществления клетка глаза представляет собой клетку сетчатки, фоторецепторную клетку, клетки пигментного эпителия сетчатки, биполярные клетки, горизонтальные клетки, амакриновые клетки, клетки Мюллера и/или ганглионарные клетки. В некоторых вариантах осуществления клетка CNS представляет собой олигодендроцит, астроцит, нейрон, клетку паренхимы головного мозга, клетку

микроглии, клетку эпендимы и/или клетку Пуркинье.

В некоторых вариантах осуществления частицы AAV по настоящему изобретению содержат капсид с одной или несколькими аминокислотными заменами в положениях 484, 487, 527, 532, 585 или 588, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAV2. В некоторых вариантах осуществления нумерация приведена по VP1 AAV2, содержащему аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену положительно заряженного аминокислотного остатка аминокислотным остатком, который не является положительно заряженным. В некоторых вариантах осуществления положительно заряженный аминокислотный остаток заменен гидрофобным аминокислотным остатком. В дополнительных вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену аргининового или лизинового остатка. В еще нескольких дополнительных вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену аргининового или лизинового остатка аланиновым остатком. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену в положениях R484, R487, K532, R585 и/или R588, нумерация которых приведена согласно VP1 AAV2. В некоторых вариантах осуществления частица gAAV содержит один или несколько капсидных белков gAAV, характеризующихся по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 91%, по меньшей мере приблизительно 92%, по меньшей мере приблизительно 93%, по меньшей мере приблизительно 94%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98%, по меньшей мере приблизительно 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 2, 4 и/или 6. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену в положении R532. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замены в положениях R484 и R487 или в положениях R585 и R588, нумерация которых приведена согласно VP1 AAV2. В дополнительных вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замены R484A и R487A или замены R585A и R588A, нумерация для которых приведена согласно VP1 AAV2. В дополнительных вариантах осуществления капсид AAV содержит аминокислотные замены R585A и R588A, нумерация для которых приведена согласно VP1 AAV-2. В некоторых вариантах осуществления частица gAAV содержит капсид AAV1, капсид AAV2, капсид AAV3, капсид AAV6, капсид AAV8, капсид AAVrh8R, капсид AAV9 или капсид AAVrh10.

В некоторых вариантах осуществления частицы AAV по настоящему изобретению содержат капсид с одной или несколькими аминокислотными заменами в положениях 485, 488, 528, 533, 586 или 589, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAVrh8R. В некоторых вариантах осуществления частицы AAV по настоящему изобретению содержат капсид с одной или несколькими аминокислотными заменами в положениях 485, 488, 528 или 533, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAVrh8R. В некоторых вариантах осуществления нумерация приведена по VP1 AAVrh8R, содержащему аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену положительно заряженного аминокислотного остатка аминокислотным остатком, который не является положительно заряженным. В некоторых вариантах осуществления положительно заряженный аминокислотный остаток заменен гидрофобным аминокислотным остатком. В дополнительных вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену аргининового или лизинового остатка. В еще нескольких дополнительных вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену аргининового или лизинового остатка аланиновым остатком. В других вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену аминокислотного остатка, который не является положительно заряженным, на положительно заряженный аминокислотный остаток. В некоторых вариантах осуществления гидрофобный аминокислотный остаток заменен положительно заряженным аминокислотным остатком. В дополнительных вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену аланинового остатка. В еще нескольких дополнительных вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену аргининового или лизинового остатка аланиновым остатком. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная замена находится в положениях 485, 488, 528, 533 или 589, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAVrh8R. В некоторых вариантах осуществления частицы AAV по настоящему изобретению содержат капсид с одной или несколькими аминокислотными заменами в положениях 485, 488, 528 или 533, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAVrh8R. В некоторых вариантах осуществления нумерация приведена по VP1 AAVrh8R, содержащему аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная замена включает замену в положениях R485, R488, R533 или T589, нумерация которых приведена согласно VP1 AAVrh8R. В некоторых вариантах осуществления частица gAAV содержит капсидный белок gAAV с SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах осуществления частица gAAV содержит один или несколько капсидных белков gAAV, характеризующихся по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 91%, по меньшей мере приблизительно 92%, по меньшей мере приблизительно 93%, по меньшей мере приблизительно 94%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по

меньшей мере приблизительно 98%, по меньшей мере приблизительно 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах осуществления одна аминокислотная замена включает замену R533A, нумерация для которой приведена согласно VP1 AAVrh8R.

В некоторых вариантах осуществления частица gAAV содержит капсид AAV1, AAV6 или AAV9, где одна или несколько аминокислотных замен находятся в положениях 485, 488, 528, 533, 586 и/или 589, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAV1, AAV6 или AAV9; и/или где частица gAAV содержит капсид AAV8 или AAVrh10, и где одна или несколько аминокислотных замен находятся в положениях 487, 490, 535, 588 и/или 591, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAV8 или AAVrh10.

В некоторых вариантах осуществления частицы AAV по настоящему изобретению содержат капсид, содержащий одну или несколько аминокислотных замен, которые изменяют связывание с HSPG (например, ослабляют или устраняют связывание с HSPG) или находятся в одном или нескольких положениях, соответствующих аминокислотам 484, 487, 527, 532, 585 или 588, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAV2, и вектор на основе gAAV, содержащий гетерологичную нуклеиновую кислоту, кодирующую терапевтический полипептид или терапевтическую нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления гетерологичная нуклеиновая кислота кодирует полипептид, выбранный из группы, состоящей из антиоксиданта, нейротрофического фактора, антиапоптозного фактора, антиангиогенного фактора и противовоспалительного фактора. В дополнительных вариантах осуществления гетерологичная нуклеиновая кислота кодирует полипептид, выбранный из группы, состоящей из Prph2, RPE65, AIPL1, GUCY2D, LCA5, CRX, CEP290, MYO 7a, кларина, ABCA4, RDH12, IMPDH1, CRB1, LRAT, NMNAT1, TULP1, MERTK, RPGR, RP2, RPGRIP, CNGA3, CNGB3, GNAT2, GDNF, CNTF, FGF2, PEDF, EPO, BCL2, BCL-X, NFκB, эндостатина, ангиостатина, sFlt, sPDGF-R, IL10, антитела к IL17, sIL17R, IL1-RA, антитела к TGFβ, sTNF-R I, sTNF-R II и IL4. В других вариантах осуществления гетерологичная нуклеиновая кислота кодирует терапевтическую нуклеиновую кислоту. В дополнительных вариантах осуществления терапевтическая нуклеиновая кислота представляет собой siRNA, shRNA, средство для RNAi, miRNA, антисмысловую РНК, рибозим или ДНК-фермент. В некоторых вариантах осуществления вектор на основе gAAV представляет собой самокомплементарный вектор на основе gAAV.

В некоторых вариантах осуществления частицы AAV по настоящему изобретению содержат капсид, содержащий одну или несколько аминокислотных замен, которые изменяют связывание с HSPG (например, ослабляют или устраняют связывание с HSPG) или находятся в одном или нескольких положениях, соответствующих аминокислотам 484, 487, 527, 532, 585 или 588, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAV2, и гетерологичную нуклеиновую кислоту, кодирующую терапевтический полипептид или терапевтическую нуклеиновую кислоту, где гетерологичная нуклеиновая кислота находится под контролем промоторной последовательности, обеспечивающей экспрессию в сетчатке. В некоторых вариантах осуществления гетерологичная нуклеиновая кислота функционально связана с промотором, подходящим для экспрессии терапевтического полипептида или терапевтической нуклеиновой кислоты в одном или нескольких типах клеток сетчатки. В некоторых вариантах осуществления клетка сетчатки представляет собой фоторецепторную клетку, клетки пигментного эпителия сетчатки, биполярные клетки, горизонтальные клетки, амакриновые клетки, клетки Мюллера и/или ганглионарные клетки. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой промотор родопсинкиназы (RK), промотор опсина, промотор цитомегаловируса (CMV), промотор β-актина курицы (CBA).

В некоторых вариантах осуществления частицы AAV по настоящему изобретению содержат капсид, содержащий одну или несколько аминокислотных замен, которые изменяют связывание с HSPG (например, ослабляют или устраняют связывание с HSPG) или находятся в одном или нескольких положениях, соответствующих аминокислотам 484, 487, 527, 532, 585 или 588, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAV2, и гетерологичную нуклеиновую кислоту для доставки гетерологичной нуклеиновой кислоты в сетчатку индивидуума. В некоторых вариантах осуществления индивидуум является человеком. В некоторых вариантах осуществления гетерологичную нуклеиновую кислоту применяют для лечения глазного нарушения, выбранного из группы, состоящей из аутосомно-рецессивной тяжелой дегенерации сетчатки с ранним началом (врожденного амавроза Лебера), врожденной ахроматопсии, болезни Штаргардта, болезни Беста, болезни Дойна, колбочковой дистрофии, пигментной дистрофии сетчатки, X-сцепленного ретиношизиса, синдрома Ашера, возрастной макулярной дегенерации, атрофической формы возрастной макулярной дегенерации, неоваскулярной формы AMD, диабетической макулопатии, пролиферативной диабетической ретинопатии (PDR), кистозного макулярного отека, центральной серозной ретинопатии, отслоения сетчатки, внутриглазного воспаления, глаукомы и заднего увеита.

В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает способы улучшения трансдукции клеток, опосредованной gAAV, после субретинальной доставки частицы gAAV в глаз индивидуума по сравнению с трансдукцией клеток, опосредованной gAAV, содержащим капсид дикого типа, при этом способ включает внедрение одной или нескольких аминокислотных замен в капсидный белок AAV в одно или несколько положений, в которых происходит взаимодействие с гепарансульфатсодержащим

протеогликаном, или в одно или несколько положений, соответствующих аминокислотам 484, 487, 527, 532, 585 или 588, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAV2; где частица гAAV содержит капсидный белок гAAV и вектор на основе гAAV, содержащий гетерологичную нуклеиновую кислоту и по меньшей мере один концевой повтор AAV.

В других аспектах настоящее изобретение предусматривает способы улучшения экспрессии гетерологичной нуклеиновой кислоты после субретинальной доставки частиц гAAV в глаз индивидуума, при этом способ включает внедрение одной или нескольких аминокислотных замен в капсидный белок AAV в одно или несколько положений, в которых происходит взаимодействие с гепарансульфатсодержащим протеогликаном, или в одно или несколько положений, соответствующих аминокислотам 484, 487, 532, 585 или 588, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAV2; где частица гAAV содержит капсидный белок гAAV и вектор на основе гAAV, содержащий гетерологичную нуклеиновую кислоту и по меньшей мере один концевой повтор AAV.

В некоторых вариантах осуществления частицы гAAV с улучшенной трансдукцией и/или улучшенной экспрессией гетерологичной нуклеиновой кислоты содержат капсид AAV серотипа 2 (AAV2). В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен ослабляют связывание частицы гAAV с гепарансульфатсодержащим протеогликаном. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен ослабляют связывание частицы гAAV с гепарансульфатсодержащим протеогликаном приблизительно по меньшей мере на 10%, приблизительно по меньшей мере на 25%, приблизительно по меньшей мере на 50%, приблизительно по меньшей мере на 75% или приблизительно по меньшей мере на 100%.

В некоторых вариантах осуществления частицы гAAV с улучшенной трансдукцией и/или улучшенной экспрессией гетерологичной нуклеиновой кислоты содержат капсид с одной или несколькими аминокислотными заменами в положениях 484, 487, 527, 532, 585 или 588, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAV2. В некоторых вариантах осуществления нумерация приведена по VP1 AAV2, содержащему аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену положительно заряженного аминокислотного остатка аминокислотным остатком, который не является положительно заряженным. В некоторых вариантах осуществления положительно заряженный аминокислотный остаток заменен гидрофобным аминокислотным остатком. В дополнительных вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену аргининового или лизинового остатка. В еще нескольких дополнительных вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену аргининового или лизинового остатка аланиновым остатком. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену в положениях R484, R487, K527, K532, R585 и/или R588, нумерация которых приведена согласно VP1 AAV2. В некоторых вариантах осуществления частица гAAV содержит один или несколько капсидных белков гAAV, характеризующихся по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 91%, по меньшей мере приблизительно 92%, по меньшей мере приблизительно 93%, по меньшей мере приблизительно 94%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98%, по меньшей мере приблизительно 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 2, 4 и/или 6. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замены в положениях R484 и R487 или в положениях R585 и R588, нумерация которых приведена согласно VP1 AAV2. В дополнительных вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замены R484A и R487A или замены R585A и R588A, нумерация для которых приведена согласно VP1 AAV2. В дополнительных вариантах осуществления капсид AAV содержит аминокислотные замены R585A и R588A, нумерация для которых приведена согласно VP1 AAV-2. В некоторых вариантах осуществления частица гAAV содержит капсид AAV1, капсид AAV2, капсид AAV3, капсид AAV6, капсид AAV8, капсид AAVrh8R, капсид AAV9 или капсид AAVrh10.

В некоторых вариантах осуществления частицы гAAV с улучшенной трансдукцией и/или улучшенной экспрессией гетерологичной нуклеиновой кислоты содержат капсид с одной или несколькими аминокислотными заменами в положениях 485, 488, 528, 533, 586 или 589, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAVrh8R. В некоторых вариантах осуществления частицы AAV по настоящему изобретению содержат капсид с одной или несколькими аминокислотными заменами в положениях 485, 488, 528 или 533, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAVrh8R. В некоторых вариантах осуществления нумерация приведена по VP1 AAVrh8R, содержащему аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену положительно заряженного аминокислотного остатка аминокислотным остатком, который не является положительно заряженным. В некоторых вариантах осуществления положительно заряженный аминокислотный остаток заменен гидрофобным аминокислотным остатком. В дополнительных вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену аргининового или лизинового остатка. В еще нескольких дополнительных вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену аргининового или лизинового остатка

аланиновым остатком. В других вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену аминокислотного остатка, который не является положительно заряженным, на положительно заряженный аминокислотный остаток. В некоторых вариантах осуществления гидрофобный аминокислотный остаток заменен положительно заряженным аминокислотным остатком. В дополнительных вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену аланинового остатка. В еще нескольких дополнительных вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену аргининового или лизинового остатка аланиновым остатком. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная замена находится в положениях 485, 488, 528, 533 или 589, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAVrh8R. В некоторых вариантах осуществления частицы AAV по настоящему изобретению содержат капсид с одной или несколькими аминокислотными заменами в положениях 485, 488, 528 или 533, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAVrh8R. В некоторых вариантах осуществления нумерация приведена по VP1 AAVrh8R, содержащему аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная замена включает замену в положениях R485, R488, R533 или T589, нумерация которых приведена согласно VP1 AAVrh8R. В некоторых вариантах осуществления частица gAAV содержит капсидный белок gAAV с SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах осуществления частица gAAV содержит один или несколько капсидных белков gAAV, характеризующихся по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 91%, по меньшей мере приблизительно 92%, по меньшей мере приблизительно 93%, по меньшей мере приблизительно 94%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98%, по меньшей мере приблизительно 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах осуществления одна аминокислотная замена включает замену R533A, нумерация для которой приведена согласно VP1 AAVrh8R.

В некоторых вариантах осуществления частицы gAAV с улучшенной трансдукцией и/или улучшенной экспрессией гетерологичной нуклеиновой кислоты содержат капсид, содержащий одну или несколько аминокислотных замен, которые изменяют связывание с HSPG (например, ослабляют или устраняют связывание с HSPG) или находятся в одном или нескольких положениях, соответствующих аминокислотам 484, 487, 527, 532, 585 или 588, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAV2, и вектор на основе gAAV, содержащий гетерологичную нуклеиновую кислоту, кодирующую терапевтический полипептид или терапевтическую нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления гетерологичная нуклеиновая кислота кодирует полипептид, выбранный из группы, состоящей из антиоксиданта, нейротрофического фактора, антиапоптозного фактора, антиангиогенного фактора и противовоспалительного фактора. В дополнительных вариантах осуществления гетерологичная нуклеиновая кислота кодирует полипептид, выбранный из группы, состоящей из Prph2, RPE65, AIPL1, GUCY2D, LCA5, CRX, CEP290, MYO 7a, кларина, ABCA4, RDH12, IMPDH1, CRB1, LRAT, NMNAT1, TULP1, MERTK, RPGR, RP2, RPGRIP, CNGA3, CNGB3, GNAT2, GDNF, CNTF, FGF2, PEDF, EPO, BCL2, BCL-X, NFkB, эндостатина, ангиостатина, sFlt, sPDGF-R, IL10, антитела к IL17, sIL17R, IL1-RA, антитела к TGFβ, sTNF-R I, sTNF-R II и IL4. В других вариантах осуществления гетерологичная нуклеиновая кислота кодирует терапевтическую нуклеиновую кислоту. В дополнительных вариантах осуществления терапевтическая нуклеиновая кислота представляет собой siRNA, shRNA, средство для RNAi, miRNA, антисмысловую РНК, рибозим или ДНК-фермент. В некоторых вариантах осуществления вектор на основе gAAV представляет собой самокомплементарный вектор на основе gAAV.

В некоторых вариантах осуществления частицы gAAV с улучшенной трансдукцией и/или улучшенной экспрессией гетерологичной нуклеиновой кислоты содержат капсид, содержащий одну или несколько аминокислотных замен, которые изменяют связывание с HSPG (например, ослабляют или устраняют связывание с HSPG) или находятся в одном или нескольких положениях, соответствующих аминокислотам 484, 487, 532, 585 или 588, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAV2, и гетерологичную нуклеиновую кислоту, кодирующую терапевтический полипептид или терапевтическую нуклеиновую кислоту, где гетерологичная нуклеиновая кислота находится под контролем промоторной последовательности, обеспечивающей экспрессию в сетчатке. В некоторых вариантах осуществления гетерологичная нуклеиновая кислота функционально связана с промотором, подходящим для экспрессии терапевтического полипептида или терапевтической нуклеиновой кислоты в одном или нескольких типах клеток сетчатки. В некоторых вариантах осуществления клетка сетчатки представляет собой фоторецепторную клетку, клетку пигментного эпителия сетчатки и/или ганглионарную клетку. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой промотор родопсинкиназы (RK), промотор опсина, промотор цитомегаловируса (CMV), промотор β-актина курицы (CBA).

В некоторых вариантах осуществления частицы gAAV с улучшенной трансдукцией и/или улучшенной экспрессией гетерологичной нуклеиновой кислоты содержат капсид, содержащий одну или несколько аминокислотных замен, которые изменяют связывание с HSPG (например, ослабляют или устраняют связывание с HSPG) или находятся в одном или нескольких положениях, соответствующих аминокислотам 484, 487, 527, 532, 585 или 588, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAV2, и гетерологичную нуклеиновую кислоту для доставки гетерологичной нуклеиновой кислоты в сетчатку.

индивидуума. В некоторых вариантах осуществления индивидуум является человеком. В некоторых вариантах осуществления гетерологичную нуклеиновую кислоту применяют для лечения глазного нарушения, выбранного из группы, состоящей из аутосомно-рецессивной тяжелой дегенерации сетчатки с ранним началом (врожденного амавроза Лебера), врожденной ахроматопсии, болезни Штаргардта, болезни Беста, болезни Дойна, колбочковой дистрофии, пигментной дистрофии сетчатки, X-сцепленного ретиношизиса, синдрома Ашера, возрастной макулярной дегенерации, атрофической формы возрастной макулярной дегенерации, неоваскулярной формы AMD, диабетической макулопатии, пролиферативной диабетической ретинопатии (PDR), кистозного макулярного отека, центральной серозной ретинопатии, отслоения сетчатки, внутриглазного воспаления, глаукомы и заднего увеита.

В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает способы лечения глазного нарушения у индивидуума (например, человека), включающие доставку композиции, содержащей частицы гAAV, в сетчатку индивидуума, где частицы гAAV содержат а) капсид гAAV, содержащий капсидный белок гAAV, содержащий одну или несколько аминокислотных замен в одном или нескольких положениях, в которых происходит взаимодействие с гепарансульфатсодержащим протеогликаном, или в одном или нескольких положениях, соответствующих аминокислотам 484, 487, 527, 532, 585 или 588, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAV2, и б) вектор на основе гAAV, содержащий гетерологичную нуклеиновую кислоту и по меньшей мере один концевой повтор AAV. В некоторых вариантах осуществления частица гAAV содержит капсид AAV серотипа 2 (AAV2). В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен ослабляют связывание частицы гAAV с гепарансульфатсодержащим протеогликаном. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен ослабляют связывание частицы гAAV с гепарансульфатсодержащим протеогликаном приблизительно по меньшей мере на 10%, приблизительно по меньшей мере на 25%, приблизительно по меньшей мере на 50%, приблизительно по меньшей мере на 75% или приблизительно по меньшей мере на 100%.

В некоторых вариантах осуществления способы включают субретинальную доставку частиц гAAV, содержащих вектор на основе гAAV, кодирующий гетерологичную нуклеиновую кислоту, применяемую в лечении глазного нарушения у индивидуума (например, человека), где частицы гAAV содержат капсид с одной или несколькими аминокислотными заменами в положениях 484, 487, 527, 532, 585 или 588, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAV2. В некоторых вариантах осуществления нумерация приведена по VP1 AAV2, содержащему аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену положительно заряженного аминокислотного остатка аминокислотным остатком, который не является положительно заряженным. В некоторых вариантах осуществления положительно заряженный аминокислотный остаток заменен гидрофобным аминокислотным остатком. В дополнительных вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену аргининового или лизинового остатка. В еще нескольких дополнительных вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену аргининового или лизинового остатка аланиновым остатком. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену в положениях R484, R487, K527, K532, R585 и/или R588, нумерация которых приведена согласно VP1 AAV2. В некоторых вариантах осуществления частица гAAV содержит один или несколько капсидных белков гAAV, характеризующихся по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 91%, по меньшей мере приблизительно 92%, по меньшей мере приблизительно 93%, по меньшей мере приблизительно 94%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98%, по меньшей мере приблизительно 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 2, 4 и/или 6. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замены в положениях R484 и R487 или в положениях R585 и R588, нумерация которых приведена согласно VP1 AAV2. В дополнительных вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замены R484A и R487A или замены R585A и R588A, нумерация для которых приведена согласно VP1 AAV2. В дополнительных вариантах осуществления капсид AAV содержит аминокислотные замены R585A и R588A, нумерация для которых приведена согласно VP1 AAV-2. В некоторых вариантах осуществления частица гAAV содержит капсид AAV1, капсид AAV2, капсид AAV3, капсид AAV6, капсид AAV8, капсид AAVrh8R, капсид AAV9 или капсид AAVrh10.

В некоторых вариантах осуществления способы включают субретинальную доставку частиц гAAV, содержащих вектор на основе гAAV, кодирующий гетерологичную нуклеиновую кислоту, применяемую в лечении глазного нарушения у индивидуума (например, человека), где частицы гAAV содержат капсид с одной или несколькими аминокислотными заменами в положениях 485, 488, 528, 533, 586 или 589, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAVrh8R. В некоторых вариантах осуществления частицы AAV по настоящему изобретению содержат капсид с одной или несколькими аминокислотными заменами в положениях 485, 488, 528 или 533, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAVrh8R. В некоторых вариантах осуществления нумерация приведена по VP1 AAVrh8R, содержащему аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления одна

или несколько аминокислотных замен включают замену положительно заряженного аминокислотного остатка аминокислотным остатком, который не является положительно заряженным. В некоторых вариантах осуществления положительно заряженный аминокислотный остаток заменен гидрофобным аминокислотным остатком. В дополнительных вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену аргининового или лизинового остатка. В еще нескольких дополнительных вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену аргининового или лизинового остатка аланиновым остатком. В других вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену аминокислотного остатка, который не является положительно заряженным, на положительно заряженный аминокислотный остаток. В некоторых вариантах осуществления гидрофобный аминокислотный остаток заменен положительно заряженным аминокислотным остатком. В дополнительных вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену аланинового остатка. В еще нескольких дополнительных вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену аргининового или лизинового остатка аланиновым остатком. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная замена находится в положениях 485, 488, 528, 533 или 589, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAVrh8R. В некоторых вариантах осуществления частицы AAV по настоящему изобретению содержат капсид с одной или несколькими аминокислотными заменами в положениях 485, 488, 528 или 533, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAVrh8R. В некоторых вариантах осуществления нумерация приведена по VP1 AAVrh8R, содержащему аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная замена включает замену в положениях R485, R488, R533 или T589, нумерация которых приведена согласно VP1 AAVrh8R. В некоторых вариантах осуществления частица gAAV содержит капсидный белок gAAV с SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах осуществления частица gAAV содержит один или несколько капсидных белков gAAV, характеризующихся по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 91%, по меньшей мере приблизительно 92%, по меньшей мере приблизительно 93%, по меньшей мере приблизительно 94%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98%, по меньшей мере приблизительно 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах осуществления одна аминокислотная замена включает замену R533A, нумерация для которой приведена согласно VP1 AAVrh8R.

В некоторых вариантах осуществления способы включают субретинальную доставку частиц gAAV, содержащих вектор на основе gAAV, кодирующий гетерологичную нуклеиновую кислоту, применяемую в лечении глазного нарушения у индивидуума (например, человека), и капсид, содержащий одну или несколько аминокислотных замен, которые изменяют связывание с HSPG (например, ослабляют или устраняют связывание с HSPG) или находятся в одном или нескольких положениях, соответствующих аминокислотам 484, 487, 527, 532, 585 или 588, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAV2. В некоторых вариантах осуществления гетерологичная нуклеиновая кислота кодирует полипептид, выбранный из группы, состоящей из антиоксиданта, нейротрофического фактора, антиапоптозного фактора, антиангиогенного фактора и противовоспалительного фактора. В дополнительных вариантах осуществления гетерологичная нуклеиновая кислота кодирует полипептид, выбранный из группы, состоящей из Prph2, RPE65, AIPL1, GUCY2D, LCA5, CRX, CEP290, MYO 7a, кларина, ABCA4, RDH12, IMPDH1, CRB1, LRAT, NMNAT1, TULP1, MERTK, RPGR, RP2, RPGRIP, CNGA3, CNGB3, GNAT2, GDNF, CNTF, FGF2, PEDF, EPO, BCL2, BCL-X, NFκB, эндостатина, ангиостатина, sFlt, sPDGF-R, IL10, антитела к IL17, siL17R, IL1-RA, антитела к TGFβ, sTNF-R I, sTNF-R II и IL4. В других вариантах осуществления гетерологичная нуклеиновая кислота кодирует терапевтическую нуклеиновую кислоту. В дополнительных вариантах осуществления терапевтическая нуклеиновая кислота представляет собой siRNA, shRNA, средство для RNAi, miRNA, антисмысловую РНК, рибозим или ДНК-фермент. В некоторых вариантах осуществления вектор на основе gAAV представляет собой самокомплементарный вектор на основе gAAV.

В некоторых вариантах осуществления способы включают субретинальную доставку частиц gAAV, содержащих вектор на основе gAAV, кодирующий гетерологичную нуклеиновую кислоту, применяемую в лечении глазного нарушения у индивидуума (например, человека), и капсид, содержащий одну или несколько аминокислотных замен, которые изменяют связывание с HSPG (например, ослабляют или устраняют связывание с HSPG) или находятся в одном или нескольких положениях, соответствующих аминокислотам 484, 487, 527, 532, 585 или 588, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAV2, где гетерологичная нуклеиновая кислота находится под контролем промоторной последовательности, обеспечивающей экспрессию в сетчатке. В некоторых вариантах осуществления гетерологичная нуклеиновая кислота функционально связана с промотором, подходящим для экспрессии терапевтического полипептида или терапевтической нуклеиновой кислоты в одном или нескольких типах клеток сетчатки. В некоторых вариантах осуществления клетка сетчатки представляет собой фоторецепторную клетку, клетку пигментного эпителия сетчатки и/или ганглионарную клетку. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой промотор родопсинкиназы (RK), промотор опсина, промотор цитомегаловируса (CMV), промотор β-актина курицы (CBA).

В некоторых вариантах осуществления способы включают субретинальную доставку частиц гAAV, содержащих вектор на основе гAAV, кодирующий гетерологичную нуклеиновую кислоту, применяемую в лечении глазного нарушения у индивидуума (например, человека), и капсид, содержащий одну или несколько аминокислотных замен, которые изменяют связывание с HSPG (например, ослабляют или устраняют связывание с HSPG) или находятся в одном или нескольких положениях, соответствующих аминокислотам 484, 487, 527, 532, 585 или 588, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAV2, где глазное нарушение выбрано из группы, состоящей из аутосомно-рецессивной тяжелой дегенерации сетчатки с ранним началом (врожденного амавроза Лебера), врожденной ахроматопсии, болезни Штаргардта, болезни Беста, болезни Дойна, колбочковой дистрофии, пигментной дистрофии сетчатки, X-сцепленного ретиношизиса, синдрома Ашера, возрастной макулярной дегенерации, атрофической формы возрастной макулярной дегенерации, неоваскулярной формы AMD, диабетической макулопатии, пролиферативной диабетической ретинопатии (PDR), кистозного макулярного отека, центральной серозной ретинопатии, отслоения сетчатки, внутриглазного воспаления, глаукомы и заднего увеита.

В некоторых вариантах осуществления способы включают субретинальную доставку композиции, содержащей частицы гAAV, где частицы гAAV содержат вектор на основе гAAV, кодирующий гетерологичную нуклеиновую кислоту, применяемую в лечении глазного нарушения у индивидуума (например, человека), и капсид, содержащий одну или несколько аминокислотных замен, которые изменяют связывание с HSPG (например, ослабляют или устраняют связывание с HSPG) или находятся в одном или нескольких положениях, соответствующих аминокислотам 484, 487, 527, 532, 585 или 588, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAV2. В некоторых вариантах осуществления концентрация частиц в композиции составляет от приблизительно 1×10^6 DRP/мл до приблизительно 1×10^{14} DRP/мл. В некоторых вариантах осуществления композиция на основе частиц гAAV является эффективной в лечении нарушений зрительной функции индивидуума. В некоторых вариантах осуществления зрительную функцию оценивают с помощью микропериметрии, периметрии глаза, адаптированного к темноте, оценки визуальной подвижности, остроты зрения, ERG или оценки чтения. В некоторых вариантах осуществления способ обуславливает улучшение зрительной функции индивидуума. В некоторых вариантах осуществления способ обуславливает предупреждение или замедление прогрессирования снижения зрительной функции человека в связи с прогрессированием глазного нарушения.

В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает системы для субретинальной доставки вектора в глаз индивидуума, содержащие: а) композицию, содержащую эффективное количество частиц гAAV, где i) капсидный белок частиц гAAV содержит одну или несколько аминокислотных замен в одном или нескольких положениях, в которых происходит взаимодействие с гепарансульфатсодержащим протеогликаном, или в одном или нескольких положениях, соответствующих аминокислотам 484, 487, 527, 532, 585 или 588, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAV2, и ii) вектор содержит гетерологичную нуклеиновую кислоту, кодирующую терапевтический полипептид или терапевтическую РНК, и по меньшей мере один концевой повтор AAV; и б) устройство для доставки гAAV в сетчатку. В некоторых вариантах осуществления устройство содержит узкую канюлю и шприц, где узкая канюля имеет калибр от 27 до 45. В некоторых вариантах осуществления композиция на основе частиц гAAV содержится в шприце. В некоторых вариантах осуществления канюля прикреплена к шприцу. В некоторых вариантах осуществления концентрация частиц в композиции составляет от приблизительно 1×10^6 DRP/мл до приблизительно 1×10^{14} DRP/мл.

В некоторых вариантах осуществления частицы гAAV системы содержат капсид AAV2, содержащий одну или несколько аминокислотных замен, которые изменяют связывание с HSPG (например, ослабляют или устраняют связывание). В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен ослабляют связывание частицы гAAV с гепарансульфатсодержащим протеогликаном. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен ослабляют связывание частицы гAAV с гепарансульфатсодержащим протеогликаном приблизительно по меньшей мере на 10%, приблизительно по меньшей мере на 25%, приблизительно по меньшей мере на 50%, приблизительно по меньшей мере на 75% или приблизительно по меньшей мере на 100%. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен повышают эффективность трансдукции клетки в глазу или CNS частицей гAAV. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен повышают эффективность трансдукции клетки в глазу или CNS частицей гAAV приблизительно по меньшей мере на 10%, приблизительно по меньшей мере на 25%, приблизительно по меньшей мере на 50%, приблизительно по меньшей мере на 75% или приблизительно по меньшей мере на 100%, например, по сравнению с эталонным капсидом гAAV, содержащим капсидный белок AAV дикого типа. В некоторых вариантах осуществления клетка глаза представляет собой клетку сетчатки, фоторецепторную клетку, клетки пигментного эпителия сетчатки, биполярные клетки, горизонтальные клетки, амакриновые клетки, клетки Мюллера и/или ганглионарные клетки. В некоторых вариантах осуществления клетка CNS представляет собой олигодендроцит, астроцит, нейрон, клетку паренхимы головного мозга, клетку микроглии, клетку эпендимы и/или клетку Пуркинье.

В некоторых вариантах осуществления частицы гAAV системы содержат капсид AAV2, содержащий одну или несколько аминокислотных замен, которые изменяют связывание с HSPG (например, ос-

лабляют или устраняют связывание). В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен находятся в положениях 484, 487, 527, 532, 585 или 588, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAV2. В некоторых вариантах осуществления нумерация приведена по VP1 AAV2, содержащему аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену положительно заряженного аминокислотного остатка аминокислотным остатком, который не является положительно заряженным. В некоторых вариантах осуществления положительно заряженный аминокислотный остаток заменен гидрофобным аминокислотным остатком. В дополнительных вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену аргининового или лизинового остатка. В еще нескольких дополнительных вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену аргининового или лизинового остатка аланиновым остатком. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену в положениях R484, R487, K527, K532, R585 и/или R588, нумерация которых приведена согласно VP1 AAV2. В некоторых вариантах осуществления частица gAAV содержит один или несколько капсидных белков gAAV, характеризующихся по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 91%, по меньшей мере приблизительно 92%, по меньшей мере приблизительно 93%, по меньшей мере приблизительно 94%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98%, по меньшей мере приблизительно 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 2, 4 и/или 6. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замены в положениях R484 и R487 или в положениях R585 и R588, нумерация которых приведена согласно VP1 AAV2. В дополнительных вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замены R484A и R487A или замены R585A и R588A, нумерация для которых приведена согласно VP1 AAV2. В дополнительных вариантах осуществления капсид AAV содержит аминокислотные замены R585A и R588A, нумерация для которых приведена согласно VP1 AAV-2. В некоторых вариантах осуществления частица gAAV содержит капсид AAV1, капсид AAV2, капсид AAV3, капсид AAV6, капсид AAV8, капсид AAVrh8R, капсид AAV9 или капсид AAVrh10.

В некоторых вариантах осуществления частицы gAAV системы содержат капсид AAV2, содержащий одну или несколько аминокислотных замен, которые изменяют связывание с HSPG (например, ослабляют или устраняют связывание). В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен находятся в положениях 485, 488, 528, 533, 586 или 589, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAVrh8R. В некоторых вариантах осуществления нумерация приведена по VP1 AAVrh8R, содержащему аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену положительно заряженного аминокислотного остатка аминокислотным остатком, который не является положительно заряженным. В некоторых вариантах осуществления положительно заряженный аминокислотный остаток заменен гидрофобным аминокислотным остатком. В дополнительных вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену аргининового или лизинового остатка. В еще нескольких дополнительных вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену аргининового или лизинового остатка аланиновым остатком. В других вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену аминокислотного остатка, который не является положительно заряженным, на положительно заряженный аминокислотный остаток. В некоторых вариантах осуществления гидрофобный аминокислотный остаток заменен положительно заряженным аминокислотным остатком. В дополнительных вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену аланинового остатка. В еще нескольких дополнительных вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену аргининового или лизинового остатка аланиновым остатком. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная замена находится в положениях 485, 488, 528, 533 или 589, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAVrh8R. В некоторых вариантах осуществления нумерация приведена по VP1 AAVrh8R, содержащему аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная замена включает замену в положениях R485, R488, R533 или T589, нумерация которых приведена согласно VP1 AAVrh8R. В некоторых вариантах осуществления частица gAAV содержит капсидный белок gAAV с SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах осуществления частица gAAV содержит один или несколько капсидных белков gAAV, характеризующихся по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 91%, по меньшей мере приблизительно 92%, по меньшей мере приблизительно 93%, по меньшей мере приблизительно 94%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98%, по меньшей мере приблизительно 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах осуществления одна аминокислотная замена включает замену R533A, нумерация для которой приведена согласно VP1 AAVrh8R.

В некоторых вариантах осуществления частицы gAAV системы содержат капсид AAV с одной или несколькими аминокислотными заменами, которые изменяют связывание с HSPG (например, ослабляют

или устраняют связывание) или находятся в одном или нескольких положениях, соответствующих аминокислотам 484, 487, 527, 532, 585 или 588, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAV2, и вектор на основе gAAV, содержащий гетерологичную нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления гетерологичная нуклеиновая кислота кодирует терапевтический полипептид или терапевтическую нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления гетерологичная нуклеиновая кислота кодирует полипептид, выбранный из группы, состоящей из антиоксиданта, нейротрофического фактора, антиапоптозного фактора, антиангиогенного фактора и противовоспалительного фактора. В дополнительных вариантах осуществления гетерологичная нуклеиновая кислота кодирует полипептид, выбранный из группы, состоящей из Prph2, RPE65, AIPL1, GUCY2D, LCA5, CRX, CEP290, MYO 7a, кларина, ABCA4, RDH12, IMPDH1, CRB1, LRAT, NMNAT1, TULP1, MERTK, RPGR, RP2, RPGRIP, CNGB3, GNAT2, GDNF, CNTF, FGF2, PEDF, EPO, BCL2, BCL-X, NFκB, эндостатина, ангиостатина, sFlt, sPDGF-R, IL10, антитела к IL17, sIL17R, IL1-RA, антитела к TGFβ, sTNF-R I, sTNF-R II и IL4. В других вариантах осуществления гетерологичная нуклеиновая кислота кодирует терапевтическую нуклеиновую кислоту. В дополнительных вариантах осуществления терапевтическая нуклеиновая кислота представляет собой siRNA, средство для RNAi, miRNA, антисмысловую РНК, рибозим или ДНК-фермент. В некоторых вариантах осуществления вектор на основе gAAV представляет собой самокомплементарный вектор на основе gAAV.

В некоторых вариантах осуществления частицы gAAV системы содержат капсид AAV с одной или несколькими аминокислотными заменами, которые изменяют связывание с HSPG (например, ослабляют или устраняют связывание) или находятся в одном или нескольких положениях, соответствующих аминокислотам 484, 487, 527, 532, 585 или 588, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAV2, и вектор на основе gAAV, содержащий гетерологичную нуклеиновую кислоту, где гетерологичная нуклеиновая кислота находится под контролем промоторной последовательности, обеспечивающей экспрессию в сетчатке. В некоторых вариантах осуществления гетерологичная нуклеиновая кислота функционально связана с промотором, подходящим для экспрессии терапевтического полипептида или терапевтической нуклеиновой кислоты в одном или нескольких типах клеток сетчатки. В некоторых вариантах осуществления клетка сетчатки представляет собой фоторецепторную клетку, клетку пигментного эпителия сетчатки и/или ганглионарную клетку. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой промотор родопсинкиназы (RK), промотор опсина, промотор цитомегаловируса (CMV), промотор β-актина курицы (CBA).

В некоторых вариантах осуществления частицы gAAV системы содержат капсид AAV с одной или несколькими аминокислотными заменами, которые изменяют связывание с HSPG (например, ослабляют или устраняют связывание) или находятся в одном или нескольких положениях, соответствующих аминокислотам 484, 487, 527, 532, 585 или 588, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAV2, и вектор на основе gAAV, содержащий гетерологичную нуклеиновую кислоту, которые применяются для доставки гетерологичной нуклеиновой кислоты в сетчатку индивидуума. В некоторых вариантах осуществления индивидуум является человеком. В некоторых вариантах осуществления гетерологичную нуклеиновую кислоту применяют для лечения глазного нарушения, выбранного из группы, состоящей из аутосомно-рецессивной тяжелой дегенерации сетчатки с ранним началом (врожденного амавроза Лебера), врожденной ахроматопсии, болезни Штаргардта, болезни Беста, болезни Дойна, колбочковой дистрофии, пигментной дистрофии сетчатки, X-сцепленного ретиношизиса, синдрома Ашера, возрастной макулярной дегенерации, атрофической формы возрастной макулярной дегенерации, неоваскулярной формы AMD, диабетической макулопатии, пролиферативной диабетической ретинопатии (PDR), кистозного макулярного отека, центральной серозной ретинопатии, отслоения сетчатки, внутриглазного воспаления, глаукомы и заднего увеита.

В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает способ доставки гетерологичной нуклеиновой кислоты в центральную нервную систему (CNS) индивидуума, включающий введение частицы рекомбинантного аденоассоциированного вируса (gAAV) в CNS индивидуума, где частица gAAV содержит а) капсид gAAV, содержащий капсидные белки gAAV, содержащие одну или несколько аминокислотных замен в одном или нескольких положениях, в которых происходит взаимодействие с гепарансульфатсодержащим протеогликаном, или в одном или нескольких положениях, соответствующих аминокислотам 484, 487, 527, 532, 585 или 588, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAV2, и б) вектор на основе gAAV, содержащий гетерологичную нуклеиновую кислоту и по меньшей мере один инвертированный концевой повтор AAV. В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает способ улучшения трансдукции клеток в центральной нервной системе (CNS) индивидуума, опосредованной gAAV, по сравнению с трансдукцией клеток, опосредованной gAAV, содержащим капсид дикого типа, при этом способ включает введение частицы рекомбинантного аденоассоциированного вируса (gAAV) в CNS индивидуума, где частица gAAV содержит а) капсид gAAV, содержащий капсидные белки gAAV, содержащие одну или несколько аминокислотных замен в одном или нескольких положениях, в которых происходит взаимодействие с гепарансульфатсодержащим протеогликаном, или в одном или нескольких положениях, соответствующих аминокислотам 484, 487, 527, 532, 585 или 588, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAV2, и б) вектор на основе gAAV, содержащий

гетерологичную нуклеиновую кислоту и по меньшей мере один инвертированный концевой повтор AAV. В дополнительных аспектах настоящее изобретение предусматривает способ улучшения экспрессии гетерологичной нуклеиновой кислоты в центральной нервной системе (CNS) индивидуума, при этом способ включает введение частицы рекомбинантного аденоассоциированного вируса (гAAV) в CNS индивидуума, где частица гAAV содержит а) капсид гAAV, содержащий капсидные белки гAAV, содержащие одну или несколько аминокислотных замен в одном или нескольких положениях, в которых происходит взаимодействие с гепарансульфатсодержащим протеогликаном, или в одном или нескольких положениях, соответствующих аминокислотам 484, 487, 527, 532, 585 или 588, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAV2, и б) вектор на основе гAAV, содержащий гетерологичную нуклеиновую кислоту и по меньшей мере один инвертированный концевой повтор AAV. В еще нескольких дополнительных аспектах настоящее изобретение предусматривает способ лечения нарушения со стороны центральной нервной системы (CNS) индивидуума, включающий введение эффективного количества композиции, содержащей частицу гAAV, в CNS индивидуума, где частица гAAV содержит а) капсид гAAV, содержащий капсидный белок гAAV, содержащий одну или несколько аминокислотных замен в одном или нескольких положениях, в которых происходит взаимодействие с гепарансульфатсодержащим протеогликаном, или в одном или нескольких положениях, соответствующих аминокислотам 484, 487, 527, 532, 585 или 588, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAV2, и б) вектор на основе гAAV, содержащий гетерологичную нуклеиновую кислоту и по меньшей мере один концевой повтор AAV.

В некоторых вариантах осуществления вышеприведенных аспектов и вариантов осуществления гетерологичная нуклеиновая кислота экспрессируется на повышенном уровне экспрессии по сравнению с уровнем экспрессии гетерологичной нуклеиновой кислоты частицы гAAV, содержащей эталонный капсид гAAV. В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии нуклеиновой кислоты повышен по меньшей мере на приблизительно 10%, по меньшей мере на приблизительно 25%, по меньшей мере на приблизительно 50%, по меньшей мере на приблизительно 75% или по меньшей мере на приблизительно 100%. В некоторых вариантах осуществления частица гAAV вызывает сниженное нейровоспаление по сравнению с частицей гAAV, содержащей эталонный капсид гAAV. В некоторых вариантах осуществления нейровоспаление снижено по меньшей мере на приблизительно 10%, по меньшей мере на приблизительно 25%, по меньшей мере на приблизительно 50%, по меньшей мере на приблизительно 75% или по меньшей мере на приблизительно 100%. В некоторых вариантах осуществления частица гAAV содержит капсид AAV серотипа 2 (AAV2). В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен ослабляют связывание частицы гAAV с гепарансульфатсодержащим протеогликаном. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен ослабляют связывание частицы гAAV с гепарансульфатсодержащим протеогликаном по сравнению со связыванием частицы гAAV, содержащей эталонный капсид гAAV, с гепарансульфатсодержащим протеогликаном. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен ослабляют связывание частицы гAAV с гепарансульфатсодержащим протеогликаном приблизительно по меньшей мере на 10%, приблизительно по меньшей мере на 25%, приблизительно по меньшей мере на 50%, приблизительно по меньшей мере на 75% или приблизительно по меньшей мере на 100%. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен ослабляют связывание частицы гAAV с гепарансульфатсодержащим протеогликаном приблизительно по меньшей мере на 10%, приблизительно по меньшей мере на 25%, приблизительно по меньшей мере на 50%, приблизительно по меньшей мере на 75% или приблизительно по меньшей мере на 100% по сравнению со связыванием частицы гAAV, содержащей эталонный капсид, с гепарансульфатсодержащим протеогликаном. В некоторых вариантах осуществления эталонный капсид гAAV включает в себя капсид или капсидный белок гAAV дикого типа. В некоторых вариантах осуществления эталонный капсид гAAV включает в себя капсид или капсидный белок гAAV, у которого отсутствуют одна или несколько аминокислотных замен в одном или нескольких положениях, в которых происходит взаимодействие с гепарансульфатсодержащим протеогликаном. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен повышают эффективность трансдукции клетки в глазу или CNS частицей гAAV. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен повышают эффективность трансдукции клетки в глазу или CNS частицей гAAV приблизительно по меньшей мере на 10%, приблизительно по меньшей мере на 25%, приблизительно по меньшей мере на 50%, приблизительно по меньшей мере на 75% или приблизительно по меньшей мере на 100%, например, по сравнению с эталонным капсидом гAAV, содержащим капсидный белок AAV дикого типа. В некоторых вариантах осуществления частица гAAV содержит капсид AAV1, капсид AAV2, капсид AAV3, капсид AAV6, капсид AAV8, капсид AAVrh8R, капсид AAV9 или капсид AAVrh10.

В некоторых вариантах осуществления вышеприведенных аспектов и вариантов осуществления введение включает прямую спинномозговую инъекцию и/или интрацеребральное введение. В некоторых вариантах осуществления интрацеребральное введение производят в участок, выбранный из группы, состоящей из большого мозга, продолговатого мозга, варолиева моста, мозжечка, полости черепа, оболочек, окружающих головной мозг, твердой мозговой оболочки, паутинной мозговой оболочки, мягкой

мозговой оболочки, цереброспинальной жидкости (CSF) субарахноидального пространства, окружающего головной мозг, глубоких мозжечковых ядер мозжечка, желудочковой системы большого мозга, субарахноидального пространства, полосатого тела, коры головного мозга, перегородки, таламуса, гипоталамуса и паренхимы головного мозга. В некоторых вариантах осуществления введение представляет собой интрацеребровентрикулярную инъекцию по меньшей мере в один боковой желудочек головного мозга. В некоторых вариантах осуществления введение представляет собой интратекальную инъекцию в шейную, грудную и/или поясничную область. В некоторых вариантах осуществления введение представляет собой интрастриарную инъекцию. В некоторых вариантах осуществления введение представляет собой внутриталамическую инъекцию. В некоторых вариантах осуществления введение представляет собой интрапаренхиматозную инъекцию. В некоторых вариантах осуществления введение включает прямую спинномозговую инъекцию, внутричерепное и/или интрацеребральное введение. В некоторых вариантах осуществления частицу gAAV вводят в один участок.

В некоторых вариантах осуществления вышеприведенных аспектов и вариантов осуществления частицу gAAV доставляют путем стереотаксической доставки. В некоторых вариантах осуществления частицу gAAV доставляют путем конвекционной доставки. В некоторых вариантах осуществления частицу gAAV вводят с помощью системы CED-доставки. В некоторых вариантах осуществления система CED-доставки содержит канюлю и/или насос. В некоторых вариантах осуществления канюля представляет собой канюлю с системой противодействия обратному току или ступенчатую канюлю. В некоторых вариантах осуществления насос представляет собой ручной насос. В некоторых вариантах осуществления насос представляет собой осмотический насос. В некоторых вариантах осуществления насос представляет собой инфузионный насос.

В некоторых вариантах осуществления вышеприведенных аспектов и вариантов осуществления гепарансульфатсодержащий протеогликан экспрессируется на одной или нескольких клетках CNS. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько клеток CNS представляют собой олигодендроцит, астроцит, нейрон, клетку паренхимы головного мозга, клетку микроглии, клетку эпендимы и/или клетку Пуркинье. В некоторых вариантах осуществления гепарансульфатсодержащий протеогликан экспрессируется на нейроне.

В некоторых вариантах осуществления вышеприведенных аспектов и вариантов осуществления гетерологичная нуклеиновая кислота экспрессируется в одной или нескольких клетках CNS. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько клеток CNS представляют собой олигодендроцит, астроцит, нейрон, клетку паренхимы головного мозга, клетку микроглии, клетку эпендимы и/или клетку Пуркинье. В некоторых вариантах осуществления гетерологичная нуклеиновая кислота экспрессируется в нейроне. В некоторых вариантах осуществления гетерологичная нуклеиновая кислота экспрессируется исключительно в нейронах.

В некоторых вариантах осуществления вышеприведенных аспектов и вариантов осуществления одна или несколько аминокислотных замен находятся в положениях 448, 451, 484, 487, 527, 532, 585 и/или 588, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAV2. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен находятся в положениях 484, 487, 527, 532, 585 или 588, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAV2. В некоторых вариантах осуществления нумерация приведена по VP1 AAV2, содержащему аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену положительно заряженного аминокислотного остатка аминокислотным остатком, который не является положительно заряженным. В некоторых вариантах осуществления положительно заряженный аминокислотный остаток заменен гидрофобным аминокислотным остатком. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену аргининового или лизинового остатка. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену аргининового или лизинового остатка аланиновым остатком. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену в положениях R347, R350, K390, K395, R448, R451, R484, R487, K527, K532, R585 и/или R588, нумерация которых приведена согласно VP1 AAV2. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену в положениях R484, R487, K527, K532, R585 и/или R588, нумерация которых приведена согласно VP1 AAV2. В некоторых вариантах осуществления частица gAAV содержит один или несколько капсидных белков gAAV, характеризующихся по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 91%, по меньшей мере приблизительно 92%, по меньшей мере приблизительно 93%, по меньшей мере приблизительно 94%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98%, по меньшей мере приблизительно 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 2, 4 и/или 6. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замены R347A, R350A, K390A, K395A, R448A, R451A, R484A, R487A, K527A, K532A, R585A и/или R588A, нумерация для которых приведена согласно VP1 AAV2. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замены в положениях R484 и R487 или в положениях R585 и R588, нумерация которых приведена согласно VP1 AAV2. В некоторых вариантах осуществления одна

или несколько аминокислотных замен включают замены R484A и R487A или замены R585A и R588A, нумерация для которых приведена согласно VP1 AAV2. В некоторых вариантах осуществления капсид AAV содержит аминокислотные замены R585A и R588A, нумерация для которых приведена согласно VP1 AAV2. В некоторых вариантах осуществления капсид AAV содержит аминокислотную замену K532A, нумерация для которой приведена согласно VP1 AAV2.

В некоторых вариантах осуществления вышеприведенных аспектов и вариантов осуществления одна или несколько аминокислотных замен находятся в положениях 485, 488, 528, 533, 586 или 589, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAVrh8R. В некоторых вариантах осуществления нумерация приведена по VP1 AAVrh8R, содержащему аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену положительно заряженного аминокислотного остатка аминокислотным остатком, который не является положительно заряженным. В некоторых вариантах осуществления положительно заряженный аминокислотный остаток заменен гидрофобным аминокислотным остатком. В дополнительных вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену аргининового или лизинового остатка. В еще нескольких дополнительных вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену аргининового или лизинового остатка аланиновым остатком. В других вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену аминокислотного остатка, который не является положительно заряженным, на положительно заряженный аминокислотный остаток. В некоторых вариантах осуществления гидрофобный аминокислотный остаток заменен положительно заряженным аминокислотным остатком. В дополнительных вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену аланинового остатка. В еще нескольких дополнительных вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену аргининового или лизинового остатка аланиновым остатком. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная замена находится в положениях 485, 488, 528, 533 или 589, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAVrh8R. В некоторых вариантах осуществления нумерация приведена по VP1 AAVrh8R, содержащему аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная замена включает замену в положениях R485, R488, R533 или T589, нумерация которых приведена согласно VP1 AAVrh8R. В некоторых вариантах осуществления частица gAAV содержит капсидный белок gAAV с SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах осуществления частица gAAV содержит один или несколько капсидных белков gAAV, характеризующихся по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 91%, по меньшей мере приблизительно 92%, по меньшей мере приблизительно 93%, по меньшей мере приблизительно 94%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98%, по меньшей мере приблизительно 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах осуществления одна аминокислотная замена включает замену R533A, нумерация для которой приведена согласно VP1 AAVrh8R.

В некоторых вариантах осуществления вышеприведенных аспектов и вариантов осуществления гетерологичная нуклеиновая кислота кодирует терапевтический полипептид или терапевтическую нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления гетерологичная нуклеиновая кислота кодирует ген, ассоциированный с CNS. В некоторых вариантах осуществления гетерологичная нуклеиновая кислота кодирует полипептид, выбранный из группы, состоящей из фермента, нейротрофического фактора, полипептида, дефицит или мутация которого наблюдаются у индивидуума с нарушением, связанным с CNS, антиоксиданта, антиапоптозного фактора, антиангиогенного фактора и противовоспалительного фактора, альфа-синуклеина, кислой бета-глюкозидазы (GBA), бета-галактозидазы-1 (GLB1), идуронат-2-сульфатазы (IDS), галактозилцерамидазы (GALC), маннозидазы, альфа-D-маннозидазы (MAN2B1), бета-маннозидазы (MANBA), псевдоарилсульфатазы A (ARSA), N-ацетилглюкозамин-1-фосфотрансферазы (GNPTAB), кислой сфингомиелиназы (ASM), белка, связанного с болезнью Ниманна-Пика типа C (NPC1), кислой альфа-1,4-глюкозидазы (GAA), бета-субъединицы гексозаминидазы, HEXB, N-сульфоглюкозаминсульфогидролазы (MPS3A), N-альфа-ацетилглюкозаминидазы (NAGLU), гепарин-ацетил-СоА-альфа-глюкозаминид-N-ацетилтрансферазы (MPS3C), N-ацетилглюкозамин-6-сульфатазы (GNS), альфа-N-ацетилгалактозаминидазы (NAGA), бета-глюкуронидазы (GUSB), альфа-субъединицы гексозаминидазы (HEXA), хантингтина (HTT), лизосомной кислой липазы (LIPA), аспартилглюкозаминидазы, альфа-галактозидазы A, пальмитоилпротеинтиоэстеразы, трипептидилпептидазы, лизосомного трансмембранного белка, транспортера цистеина, кислой церамидазы, кислой альфа-L-фукозидазы, катепсина A, альфа-L-идуронидазы, арилсульфатазы B, арилсульфатазы A, N-ацетилгалактозамин-6-сульфатазы, кислой бета-галактозидазы или альфа-нейраминидазы. В некоторых вариантах осуществления гетерологичная нуклеиновая кислота кодирует полипептид, выбранный из группы, состоящей из белка, ингибирующего апоптоз нейронов (NAIP), фактора роста нервов (NGF), глиального фактора роста (GDNF), мозгового фактора роста (BDNF), цилиарного нейротрофического фактора (CNTF), тирозингидроксилазы (TH), GTP-циклогидролазы (GTPCH), декарбоксилазы аминокислот (AADC), антиоксиданта, антиангиогенного полипептида, противовоспалительного полипептида и аспартоцилазы (ASPA). В некоторых вариантах осуществления гетерологичная нуклеиновая кислота кодирует терапевтическую нук-

леиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления терапевтическая нуклеиновая кислота представляет собой siRNA, shRNA, средство для RNAi, miRNA, антисмысловую РНК, рибозим или ДНК-фермент. В некоторых вариантах осуществления гетерологичная нуклеиновая кислота находится под контролем промоторной последовательности, обеспечивающей экспрессию в одной или нескольких клетках CNS. В некоторых вариантах осуществления гетерологичная нуклеиновая кислота находится под контролем промоторной последовательности, выбранной из группы, состоящей из немедленно-раннего промотора цитомегаловируса (CMV), LTR RSV, LTR MoMLV, промотора фосфоглицераткиназы-1 (PGK), промотора вируса обезьян 40 (SV40), промотора СК6, промотора транстиретина (TTR), промотора ТК, тетрациклин-чувствительного промотора (TRE), промотора HBV, промотора hAAT, LSP-промотора, химерного печень-специфичного промотора (LSP), промотора E2F, промотора теломеразы (hTERT); составного промотора энхансер цитомегаловируса/промотор бета-актина курицы/промотор β -глобина кролика (CAG), промотора фактора элонгации 1-альфа (EF1-альфа), промотора β -глюкуронидазы человека, промотора β -актина курицы (CBA), ретровирусного промотора LTR вируса саркомы Рауса (RSV), промотора дигидрофолатредуктазы и промотора I3-актина. В некоторых вариантах осуществления гетерологичная нуклеиновая кислота функционально связана с промотором, подходящим для экспрессии терапевтического полипептида или терапевтической нуклеиновой кислоты в одной или нескольких клетках CNS. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько клеток CNS включают в себя одну или несколько клеток головного мозга. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько клеток CNS представляют собой олигодендроцит, астроцит, нейрон, клетку паренхимы головного мозга, клетку микроглии, клетку эпендимы и/или клетку Пуркинье. В некоторых вариантах осуществления клетка головного мозга представляет собой нейрон.

В некоторых вариантах осуществления вышеприведенных аспектов и вариантов осуществления вектор на основе gAAV представляет собой самокомплементарный вектор на основе gAAV. В некоторых вариантах осуществления вектор содержит первую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую гетерологичную нуклеиновую кислоту, и вторую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую комплементарную последовательность нуклеиновой кислоты, где первая последовательность нуклеиновой кислоты может образовывать внутрицепочечные пары оснований со второй последовательностью нуклеиновой кислоты вдоль большей части или всей ее длины. В некоторых вариантах осуществления первая последовательность нуклеиновой кислоты и вторая последовательность нуклеиновой кислоты соединены мутантным ITR AAV, где мутантный ITR AAV характеризуется делецией D-области и характеризуется мутацией последовательности концевой разрешения.

В некоторых вариантах осуществления вышеприведенных аспектов и вариантов осуществления индивидум является человеком.

В некоторых вариантах осуществления вышеприведенных аспектов и вариантов осуществления гетерологичная нуклеиновая кислота кодирует терапевтический полипептид или терапевтическую нуклеиновую кислоту, применяемые для лечения нарушения со стороны CNS. В некоторых вариантах осуществления нарушение со стороны CNS представляет собой лизосомную болезнь накопления (LSD), болезнь Хантингтона, эпилепсию, болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера, инсульт, кортикобазальную дегенерацию (CBD), кортикобазальную ганглиозную дегенерацию (CBGD), лобно-височную деменцию (FTD), множественную системную атрофию (MSA), прогрессирующий надъядерный паралич (PSP) или рак головного мозга. В некоторых вариантах осуществления нарушение представляет собой лизосомную болезнь накопления, выбранную из группы, состоящей из аспартилглюкозаминурии, болезни Фабри, инфантильной формы болезни Баттена (CNL1), классической поздней инфантильной формы болезни Баттена (CNL2), ювенильной формы болезни Баттена (CNL3), болезни Баттена формы CNL4, болезни Баттена формы CNL5, болезни Баттена формы CNL6, болезни Баттена формы CNL7, болезни Баттена формы CNL8, цистиноза, болезни Фарбера, фукозидоза, галактосиалидоза, болезни Гоше 1 типа, болезни Гоше 2 типа, болезни Гоше 3 типа, GM1-ганглиозидоза, болезни Хантера, болезни Краббе, заболевания, представляющего собой α -маннозидоз, заболевания, представляющего собой β -маннозидоз, болезни Марото-Лами, заболевания, представляющего собой метахроматическую лейкодистрофию, болезни Моркио типа А, болезни Моркио типа В, заболевания, представляющего собой муколипидоз II/III типа, болезни Ниманна-Пика типа А, болезни Ниманна-Пика типа В, болезни Ниманна-Пика типа С, болезни Помпе, болезни Сандхоффа, болезни Санфилиппо типа А, болезни Санфилиппо типа В, болезни Санфилиппо типа С, болезни Санфилиппо типа D, болезни Шиндлера, болезни Канзаки-Шиндлера, сиалидоза, болезни Слая, болезни Тея-Сакса и болезни Вольмана. В некоторых вариантах осуществления нарушение со стороны CNS представляет собой болезнь Хантингтона или болезнь Паркинсона.

В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает способ лечения болезни Хантингтона у индивидума, включающий введение эффективного количества композиции, содержащей частицу рекомбинантного аденоассоциированного вируса (gAAV), в полосатое тело индивидума, где частица gAAV содержит а) капсид gAAV, содержащий капсидный белок gAAV, содержащий одну или несколько аминокислотных замен в одном или нескольких положениях, в которых происходит взаимодействие с гепарансульфатсодержащим протеогликаном, или в одном или нескольких положениях, соответствующих аминокислотам 484, 487, 527, 532, 585 или 588, нумерация которых приведена согласно нумерации

VP1 AAV2, и b) вектор на основе гAAV, содержащий гетерологичную нуклеиновую кислоту и по меньшей мере один концевой повтор AAV. В некоторых вариантах осуществления гетерологичная нуклеиновая кислота кодирует терапевтический полипептид или терапевтическую нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления терапевтический полипептид представляет собой полипептид хантингтин или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления полипептид хантингтин или его фрагмент представляет собой функциональный полипептид хантингтин или его функциональный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления терапевтическая нуклеиновая кислота включает в себя средство для RNAi, направленное на хантингтин. В некоторых вариантах осуществления средство для RNAi представляет собой miRNA.

В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает способ лечения болезни Паркинсона у индивидуума, включающий введение эффективного количества композиции, содержащей частицу рекомбинантного аденоассоциированного вируса (гAAV), в полосатое тело индивидуума, где частица гAAV содержит а) капсид гAAV, содержащий капсидный белок гAAV, содержащий одну или несколько аминокислотных замен в одном или нескольких положениях, в которых происходит взаимодействие с гепарансульфатсодержащим протеогликаном, или в одном или нескольких положениях, соответствующих аминокислотам 484, 487, 527, 532, 585 или 588, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAV2, и b) вектор на основе гAAV, содержащий гетерологичную нуклеиновую кислоту и по меньшей мере один концевой повтор AAV. В некоторых вариантах осуществления гетерологичная нуклеиновая кислота кодирует терапевтический полипептид или терапевтическую нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления терапевтический полипептид представляет собой TH, GTPCII, GDNF, BDNF, и/или AADC, или их фрагмент. В некоторых вариантах осуществления терапевтический полипептид представляет собой AADC или ее фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления вышеприведенных аспектов и вариантов осуществления гетерологичная нуклеиновая кислота экспрессируется на повышенном уровне экспрессии по сравнению с уровнем экспрессии гетерологичной нуклеиновой кислоты частицы гAAV, содержащей эталонный капсид гAAV. В некоторых вариантах осуществления частица гAAV вызывает сниженное нейровоспаление по сравнению с частицей гAAV, содержащей эталонный капсид гAAV. В некоторых вариантах осуществления частица гAAV содержит капсид AAV серотипа 2 (AAV2). В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен ослабляют связывание частицы гAAV с гепарансульфатсодержащим протеогликаном. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен ослабляют связывание частицы гAAV с гепарансульфатсодержащим протеогликаном по сравнению со связыванием частицы гAAV, содержащей эталонный капсид гAAV, с гепарансульфатсодержащим протеогликаном. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен ослабляют связывание частицы гAAV с гепарансульфатсодержащим протеогликаном приблизительно по меньшей мере на 10%, приблизительно по меньшей мере на 25%, приблизительно по меньшей мере на 50%, приблизительно по меньшей мере на 75% или приблизительно по меньшей мере на 100%. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен ослабляют связывание частицы гAAV с гепарансульфатсодержащим протеогликаном приблизительно по меньшей мере на 10%, приблизительно по меньшей мере на 25%, приблизительно по меньшей мере на 50%, приблизительно по меньшей мере на 75% или приблизительно по меньшей мере на 100% по сравнению со связыванием частицы гAAV, содержащей эталонный капсид, с гепарансульфатсодержащим протеогликаном. В некоторых вариантах осуществления эталонный капсид гAAV включает в себя капсид или капсидный белок гAAV дикого типа. В некоторых вариантах осуществления эталонный капсид гAAV включает в себя капсид или капсидный белок гAAV, у которого отсутствуют одна или несколько аминокислотных замен в одном или нескольких положениях, в которых происходит взаимодействие с гепарансульфатсодержащим протеогликаном.

В некоторых вариантах осуществления вышеприведенных аспектов и вариантов осуществления частицу гAAV доставляют путем стереотаксической доставки. В некоторых вариантах осуществления частицу гAAV доставляют путем конвекционной доставки. В некоторых вариантах осуществления частицу гAAV вводят с помощью системы CED-доставки. В некоторых вариантах осуществления канюля представляет собой канюлю с системой противодействия обратному току или ступенчатую канюлю. В некоторых вариантах осуществления система CED-доставки содержит канюлю и/или насос. В некоторых вариантах осуществления частицу гAAV вводят с помощью системы CED-доставки. В некоторых вариантах осуществления насос представляет собой ручной насос. В некоторых вариантах осуществления насос представляет собой осмотический насос. В некоторых вариантах осуществления насос представляет собой инфузионный насос.

В некоторых вариантах осуществления вышеприведенных аспектов и вариантов осуществления гепарансульфатсодержащий протеогликан экспрессируется на одной или нескольких клетках CNS. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько клеток CNS представляют собой олигодендроцит, астроцит, нейрон, клетку паренхимы головного мозга, клетку микроглии, клетку эпендимы и/или клетку Пуркинье. В некоторых вариантах осуществления гепарансульфатсодержащий протеогликан экспрессируется на нейроне.

В некоторых вариантах осуществления вышеприведенных аспектов и вариантов осуществления гетерологичная нуклеиновая кислота экспрессируется в одной или нескольких клетках CNS. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько клеток CNS представляют собой олигодендроцит, астроцит, нейрон, клетку паренхимы головного мозга, клетку микроглии, клетку эпендимы и/или клетку Пуркинье. В некоторых вариантах осуществления гетерологичная нуклеиновая кислота экспрессируется в нейроне. В некоторых вариантах осуществления гетерологичная нуклеиновая кислота экспрессируется исключительно в нейронах.

В некоторых вариантах осуществления вышеприведенных аспектов и вариантов осуществления одна или несколько аминокислотных замен находятся в положениях 484, 487, 527, 532, 585 или 588, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAV2. В некоторых вариантах осуществления нумерация приведена по VP1 AAV2, содержащему аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену положительно заряженного аминокислотного остатка аминокислотным остатком, который не является положительно заряженным. В некоторых вариантах осуществления положительно заряженный аминокислотный остаток заменен гидрофобным аминокислотным остатком. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену аргининового или лизинового остатка. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену аргининового или лизинового остатка аланиновым остатком. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену в положениях R347, R350, K390, K395, R448, R451, R484, R487, K527, K532, R585 и/или R588, нумерация которых приведена согласно VP1 AAV2. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену в положениях R484, R487, K527, K532, R585 и/или R588, нумерация которых приведена согласно VP1 AAV2. В некоторых вариантах осуществления частица гAAV содержит один или несколько капсидных белков гAAV, характеризующихся по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 91%, по меньшей мере приблизительно 92%, по меньшей мере приблизительно 93%, по меньшей мере приблизительно 94%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98%, по меньшей мере приблизительно 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 2, 4 и/или 6. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замены R347A, R350A, K390A, K395A, R448A, R451A, R484A, R487A, K527A, K532A, R585A и/или R588A, нумерация для которых приведена согласно VP1 AAV2. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замены в положениях R484 и R487 или в положениях R585 и R588, нумерация которых приведена согласно VP1 AAV2. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замены R484A и R487A или замены R585A и R588A, нумерация для которых приведена согласно VP1 AAV2. В некоторых вариантах осуществления капсид AAV содержит аминокислотные замены R585A и R588A, нумерация для которых приведена согласно VP1 AAV2. В некоторых вариантах осуществления капсид AAV содержит аминокислотную замену K532A, нумерация для которой приведена согласно VP1 AAV2.

В некоторых вариантах осуществления вышеприведенных аспектов и вариантов осуществления одна или несколько аминокислотных замен находятся в положениях 485, 488, 528, 533, 586 или 589, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAVrh8R. В некоторых вариантах осуществления частицы AAV по настоящему изобретению содержат капсид с одной или несколькими аминокислотными заменами в положениях 485, 488, 528 или 533, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAVrh8R. В некоторых вариантах осуществления нумерация приведена по VP1 AAVrh8R, содержащему аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену положительно заряженного аминокислотного остатка аминокислотным остатком, который не является положительно заряженным. В некоторых вариантах осуществления положительно заряженный аминокислотный остаток заменен гидрофобным аминокислотным остатком. В дополнительных вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену аргининового или лизинового остатка. В еще нескольких дополнительных вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену аргининового или лизинового остатка аланиновым остатком. В других вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену аминокислотного остатка, который не является положительно заряженным, на положительно заряженный аминокислотный остаток. В некоторых вариантах осуществления гидрофобный аминокислотный остаток заменен положительно заряженным аминокислотным остатком. В дополнительных вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену аланинового остатка. В еще нескольких дополнительных вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену аргининового или лизинового остатка аланиновым остатком. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная замена находится в положениях 485, 488, 528, 533 или 589, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAVrh8R. В некоторых вариантах осуществления нумерация приведена по VP1 AAVrh8R, содержащему аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная замена

включает замену в положениях R485, R488, R533 или T589, нумерация которых приведена согласно VP1 AAVrh8R. В некоторых вариантах осуществления частица gAAV содержит капсидный белок gAAV с SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах осуществления частица gAAV содержит один или несколько капсидных белков gAAV, характеризующихся по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 91%, по меньшей мере приблизительно 92%, по меньшей мере приблизительно 93%, по меньшей мере приблизительно 94%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98%, по меньшей мере приблизительно 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах осуществления одна аминокислотная замена включает замену R533A, нумерация для которой приведена согласно VP1 AAVrh8R. В некоторых вариантах осуществления частица gAAV содержит капсид AAV1, капсид AAV2, капсид AAV3, капсид AAV6, капсид AAV8, капсид AAVrh8R, капсид AAV9 или капсид AAVrh10.

В некоторых вариантах осуществления вышеприведенных аспектов и вариантов осуществления гетерологичная нуклеиновая кислота находится под контролем промоторной последовательности, обеспечивающей экспрессию в одной или нескольких клетках CNS. В некоторых вариантах осуществления гетерологичная нуклеиновая кислота находится под контролем промоторной последовательности, выбранной из группы, состоящей из немедленно-раннего промотора цитомегаловируса (CMV), LTR RSV, LTR MoMLV, промотора фосфоглицераткиназы-1 (PGK), промотора вируса обезьян 40 (SV40), промотора СК6, промотора транстиретина (TTR), промотора ТК, тетрациклин-чувствительного промотора (TRE), промотора HBV, промотора hAAT, LSP-промотора, химерного печень-специфичного промотора (LSP), промотора E2F, промотора теломеразы (hTERT); составного промотора энхансер цитомегаловируса/промотор бета-актина курицы/промотор β-глобина кролика (CAG), промотора фактора элонгации 1-альфа (EF1-альфа), промотора β-глюкуронидазы человека, промотора β-актина курицы (CBA), ретровирусного промотора LTR вируса саркомы Рауса (RSV), промотора дигидрофолатредуктазы и промотора I3-актина. В некоторых вариантах осуществления гетерологичная нуклеиновая кислота функционально связана с промотором, подходящим для экспрессии терапевтического полипептида или терапевтической нуклеиновой кислоты в одной или нескольких клетках CNS. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько клеток CNS включают в себя одну или несколько клеток головного мозга. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько клеток CNS представляют собой олигодендроцит, астроцит, нейрон, клетку паренхимы головного мозга, клетку микроглии, клетку эпендимы и/или клетку Пуркинье. В некоторых вариантах осуществления клетка головного мозга представляет собой нейрон.

В некоторых вариантах осуществления вышеприведенных аспектов и вариантов осуществления вектор на основе gAAV представляет собой самокомплементарный вектор на основе gAAV. В некоторых вариантах осуществления вектор содержит первую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую гетерологичную нуклеиновую кислоту, и вторую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую комплементарную последовательность нуклеиновой кислоты, где первая последовательность нуклеиновой кислоты может образовывать внутрицепочечные пары оснований со второй последовательностью нуклеиновой кислоты вдоль большей части или всей ее длины. В некоторых вариантах осуществления первая последовательность нуклеиновой кислоты и вторая последовательность нуклеиновой кислоты соединены мутантным ITR AAV, где мутантный ITR AAV характеризуется делецией D-области и характеризуется мутацией последовательности концевой разрешения.

В некоторых вариантах осуществления вышеприведенных аспектов и вариантов осуществления индивидум является человеком.

В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает набор для применения в любом из вышеприведенных вариантов осуществления, содержащий частицу рекомбинантного аденоассоциированного вируса (gAAV), где частица gAAV содержит а) капсид gAAV, содержащий капсидные белки gAAV, содержащие одну или несколько аминокислотных замен в одном или нескольких положениях, в которых происходит взаимодействие с гепарансульфатсодержащим протеогликаном, или в одном или нескольких положениях, соответствующих аминокислотам 484, 487, 527, 532, 585 или 588, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAV2, и б) вектор на основе gAAV, содержащий гетерологичную нуклеиновую кислоту и по меньшей мере один инвертированный концевой повтор AAV. В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает набор для доставки гетерологичной нуклеиновой кислоты в центральную нервную систему (CNS) индивидума, содержащий композицию, содержащую частицу рекомбинантного аденоассоциированного вируса (gAAV), где частица gAAV содержит а) капсид gAAV, содержащий капсидные белки gAAV, содержащие одну или несколько аминокислотных замен в одном или нескольких положениях, в которых происходит взаимодействие с гепарансульфатсодержащим протеогликаном, и б) вектор на основе gAAV, содержащий гетерологичную нуклеиновую кислоту и по меньшей мере один инвертированный концевой повтор AAV. В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает набор для лечения нарушения со стороны центральной нервной системы (CNS) у индивидума, содержащий композицию, содержащую частицу рекомбинантного аденоассоциированного вируса (gAAV), где частица gAAV содержит а) капсид gAAV, содержащий капсидные белки gAAV, содержащие одну или несколько аминокислотных замен в одном или нескольких положе-

ниях, в которых происходит взаимодействие с гепарансульфатсодержащим протеогликаном, и б) вектор на основе гAAV, содержащий гетерологичную нуклеиновую кислоту для лечения нарушения со стороны CNS и по меньшей мере один инвертированный концевой повтор AAV.

В некоторых вариантах осуществления вышеприведенных аспектов и вариантов осуществления нарушение со стороны CNS представляет собой болезнь Хантингтона. В некоторых вариантах осуществления гетерологичная нуклеиновая кислота кодирует терапевтический полипептид или терапевтическую нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления терапевтический полипептид представляет собой полипептид хантингтин или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления полипептид хантингтин или его фрагмент представляет собой функциональный полипептид хантингтин или его функциональный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления терапевтическая нуклеиновая кислота включает в себя средство для RNAi, направленное на хантингтин. В некоторых вариантах осуществления средство для RNAi представляет собой miRNA. В некоторых вариантах осуществления нарушение со стороны CNS представляет собой болезнь Паркинсона. В некоторых вариантах осуществления гетерологичная нуклеиновая кислота кодирует терапевтический полипептид или терапевтическую нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления терапевтический полипептид представляет собой TH, GTPCII, GDNF, BDNF, и/или AADC, или их фрагмент. В некоторых вариантах осуществления терапевтический полипептид представляет собой AADC или ее фрагмент.

В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает частицу рекомбинантного аденоассоциированного вируса (гAAV) для применения в любом из вышеприведенных вариантов осуществления. В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает частицу рекомбинантного аденоассоциированного вируса (гAAV) для доставки гетерологичной нуклеиновой кислоты в центральную нервную систему (CNS) индивидуума, где частица гAAV содержит а) капсид гAAV, содержащий капсидные белки гAAV, содержащие одну или несколько аминокислотных замен в одном или нескольких положениях, в которых происходит взаимодействие с гепарансульфатсодержащим протеогликаном, или в одном или нескольких положениях, соответствующих аминокислотам 484, 487, 527, 532, 585 или 588, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAV2, и б) вектор на основе гAAV, содержащий гетерологичную нуклеиновую кислоту и по меньшей мере один инвертированный концевой повтор AAV. В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает частицу рекомбинантного аденоассоциированного вируса (гAAV) для лечения нарушения со стороны центральной нервной системы (CNS) у индивидуума, где частица гAAV содержит а) капсид гAAV, содержащий капсидный белок гAAV, содержащий одну или несколько аминокислотных замен в одном или нескольких положениях, в которых происходит взаимодействие с гепарансульфатсодержащим протеогликаном, или в одном или нескольких положениях, соответствующих аминокислотам 484, 487, 527, 532, 585 или 588, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAV2, и б) вектор на основе гAAV, содержащий гетерологичную нуклеиновую кислоту и по меньшей мере один концевой повтор AAV. В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает частицу рекомбинантного аденоассоциированного вируса (гAAV) для лечения болезни Хантингтона у индивидуума, где частица гAAV содержит а) капсид гAAV, содержащий капсидный белок гAAV, содержащий одну или несколько аминокислотных замен в одном или нескольких положениях, в которых происходит взаимодействие с гепарансульфатсодержащим протеогликаном, или в одном или нескольких положениях, соответствующих аминокислотам 484, 487, 527, 532, 585 или 588, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAV2, и б) вектор на основе гAAV, содержащий гетерологичную нуклеиновую кислоту и по меньшей мере один концевой повтор AAV, где частица гAAV составлена для доставки в полосатое тело. В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает частицу рекомбинантного аденоассоциированного вируса (гAAV) для лечения болезни Паркинсона у индивидуума, где частица гAAV содержит а) капсид гAAV, содержащий капсидный белок гAAV, содержащий одну или несколько аминокислотных замен в одном или нескольких положениях, в которых происходит взаимодействие с гепарансульфатсодержащим протеогликаном, или в одном или нескольких положениях, соответствующих аминокислотам 484, 487, 527, 532, 585 или 588, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAV2, и б) вектор на основе гAAV, содержащий гетерологичную нуклеиновую кислоту и по меньшей мере один концевой повтор AAV, где частица гAAV составлена для доставки в один участок (например, в CNS индивидуума). В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает частицу рекомбинантного аденоассоциированного вируса (гAAV) для лечения болезни Паркинсона у индивидуума, где частица гAAV содержит а) капсид гAAV, содержащий капсидный белок гAAV, содержащий одну или несколько аминокислотных замен в одном или нескольких положениях, в которых происходит взаи-

модействие с гепарансульфатсодержащим протеогликаном, или в одном или нескольких положениях, соответствующих аминокислотам 484, 487, 527, 532, 585 или 588, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAV2, и б) вектор на основе gAAV, содержащий гетерологичную нуклеиновую кислоту и по меньшей мере один концевой повтор AAV, где частица gAAV составлена для доставки в один участок (например, в CNS индивидуума).

В некоторых вариантах осуществления вышеприведенных аспектов и вариантов осуществления гетерологичная нуклеиновая кислота экспрессируется на повышенном уровне экспрессии по сравнению с уровнем экспрессии гетерологичной нуклеиновой кислоты частицы gAAV, содержащей эталонный капсид gAAV. В некоторых вариантах осуществления частица gAAV вызывает сниженное нейровоспаление по сравнению с частицей gAAV, содержащей капсид gAAV, представляющий собой, в частности, эталонный капсид. В некоторых вариантах осуществления частица gAAV содержит капсид AAV серотипа 2 (AAV2). В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен ослабляют связывание частицы gAAV с гепарансульфатсодержащим протеогликаном. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен ослабляют связывание частицы gAAV с гепарансульфатсодержащим протеогликаном по сравнению со связыванием частицы gAAV, содержащей эталонный капсид gAAV, с гепарансульфатсодержащим протеогликаном. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен ослабляют связывание частицы gAAV с гепарансульфатсодержащим протеогликаном приблизительно по меньшей мере на 10%, приблизительно по меньшей мере на 25%, приблизительно по меньшей мере на 50%, приблизительно по меньшей мере на 75% или приблизительно по меньшей мере на 100%. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен ослабляют связывание частицы gAAV с гепарансульфатсодержащим протеогликаном приблизительно по меньшей мере на 10%, приблизительно по меньшей мере на 25%, приблизительно по меньшей мере на 50%, приблизительно по меньшей мере на 75% или приблизительно по меньшей мере на 100% по сравнению со связыванием частицы gAAV, содержащей эталонный капсид, с гепарансульфатсодержащим протеогликаном. В некоторых вариантах осуществления эталонный капсид gAAV включает в себя капсид или капсидный белок gAAV дикого типа. В некоторых вариантах осуществления эталонный капсид gAAV включает в себя капсид или капсидный белок gAAV, у которого отсутствуют одна или несколько аминокислотных замен в одном или нескольких положениях, в которых происходит взаимодействие с гепарансульфатсодержащим протеогликаном.

В некоторых вариантах осуществления вышеприведенных аспектов и вариантов осуществления гепарансульфатсодержащий протеогликан экспрессируется на одной или нескольких клетках CNS. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько клеток CNS представляют собой олигодендроцит, астроцит, нейрон, клетку паренхимы головного мозга, клетку микроглии, клетку эпендимы и/или клетку Пуркинье. В некоторых вариантах осуществления гепарансульфатсодержащий протеогликан экспрессируется на нейроне.

В некоторых вариантах осуществления вышеприведенных аспектов и вариантов осуществления гетерологичная нуклеиновая кислота экспрессируется в одной или нескольких клетках CNS. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько клеток CNS представляют собой олигодендроцит, астроцит, нейрон, клетку паренхимы головного мозга, клетку микроглии, клетку эпендимы и/или клетку Пуркинье. В некоторых вариантах осуществления гетерологичная нуклеиновая кислота экспрессируется в нейроне. В некоторых вариантах осуществления гетерологичная нуклеиновая кислота экспрессируется исключительно в нейронах.

В некоторых вариантах осуществления вышеприведенных аспектов и вариантов осуществления одна или несколько аминокислотных замен находятся в положениях 484, 487, 527, 532, 585 или 588, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAV2. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену положительно заряженного аминокислотного остатка аминокислотным остатком, который не является положительно заряженным. В некоторых вариантах осуществления положительно заряженный аминокислотный остаток заменен гидрофобным аминокислотным остатком. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену аргининового или лизинового остатка. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену аргининового или лизинового остатка аланиновым остатком. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену в положениях R347, R350, K390, K395, R448, R451, R484, R487, K527, K532, R585 и/или R588, нумерация которых приведена согласно VP1 AAV2. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену в положениях R484, R487, K527, K532, R585 и/или R588, нумерация которых приведена согласно VP1 AAV2. В некоторых вариантах осуществления частица gAAV содержит частица gAAV содержит один или несколько капсидных белков gAAV, характеризующихся по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 91%, по меньшей мере приблизительно 92%, по меньшей мере приблизительно 93%, по меньшей мере приблизительно 94%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98%, по меньшей мере приблизительно 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 2, 4 и/или 6. В некоторых вариантах осуществ-

ления одна или несколько аминокислотных замен включают замены R347A, R350A, K390A, K395A, R448A, R451A, R484A, R487A, K527A, K532A, R585A и/или R588A, нумерация для которых приведена согласно VP1 AAV2. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замены в положениях R484 и R487 или в положениях R585 и R588, нумерация которых приведена согласно VP1 AAV2. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замены R484A и R487A или замены R585A и R588A, нумерация для которых приведена согласно VP1 AAV2. В некоторых вариантах осуществления капсид AAV содержит аминокислотные замены R585A и R588A, нумерация для которых приведена согласно VP1 AAV2. В некоторых вариантах осуществления капсид AAV содержит аминокислотную замену K532A, нумерация для которой приведена согласно VP1 AAV2. В некоторых вариантах осуществления частица gAAV содержит капсид AAV1, капсид AAV2, капсид AAV3, капсид AAV6, капсид AAV8, капсид AAVrh8R, капсид AAV9 или капсид AAVrh10.

В некоторых вариантах осуществления вышеприведенных аспектов и вариантов осуществления одна или несколько аминокислотных замен находятся в положениях 485, 488, 528, 533, 586 или 589, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAVrh8R. В некоторых вариантах осуществления нумерация приведена по VP1 AAVrh8R, содержащему аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену положительно заряженного аминокислотного остатка аминокислотным остатком, который не является положительно заряженным. В некоторых вариантах осуществления положительно заряженный аминокислотный остаток заменен гидрофобным аминокислотным остатком. В дополнительных вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену аргининового или лизинового остатка. В еще нескольких дополнительных вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену аргининового или лизинового остатка аланиновым остатком. В других вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену аминокислотного остатка, который не является положительно заряженным, на положительно заряженный аминокислотный остаток. В некоторых вариантах осуществления гидрофобный аминокислотный остаток заменен положительно заряженным аминокислотным остатком. В дополнительных вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену аланинового остатка. В еще нескольких дополнительных вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену аргининового или лизинового остатка аланиновым остатком. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная замена находится в положениях 485, 488, 528, 533 или 589, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAVrh8R. В некоторых вариантах осуществления нумерация приведена по VP1 AAVrh8R, содержащему аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная замена включает замену в положениях R485, R488, R533 или T589, нумерация которых приведена согласно VP1 AAVrh8R. В некоторых вариантах осуществления частица gAAV содержит капсидный белок gAAV с SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах осуществления частица gAAV содержит один или несколько капсидных белков gAAV, характеризующихся по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 91%, по меньшей мере приблизительно 92%, по меньшей мере приблизительно 93%, по меньшей мере приблизительно 94%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98%, по меньшей мере приблизительно 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах осуществления одна аминокислотная замена включает замену R533A, нумерация для которой приведена согласно VP1 AAVrh8R.

В некоторых вариантах осуществления вышеприведенных аспектов и вариантов осуществления гетерологичная нуклеиновая кислота находится под контролем промоторной последовательности, обеспечивающей экспрессию в одной или нескольких клетках CNS. В некоторых вариантах осуществления гетерологичная нуклеиновая кислота находится под контролем промоторной последовательности, выбранной из группы, состоящей из немедленно-раннего промотора цитомегаловируса (CMV), LTR RSV, LTR MoMLV, промотора фосфолипидкиназы-1 (PGK), промотора вируса обезьян 40 (SV40), промотора СК6, промотора транскриптора (TTR), промотора ТК, тетрациклин-чувствительного промотора (TRE), промотора HBV, промотора hAAT, LSP-промотора, химерного печень-специфичного промотора (LSP), промотора E2F, промотора теломеразы (hTERT); составного промотора энхансер цитомегаловируса/промотор бета-актина курицы/промотор β-глобина кролика (CAG), промотора фактора элонгации 1-альфа (EF1-альфа), промотора β-глюкуронидазы человека, промотора β-актина курицы (CBA), ретровирусного промотора LTR вируса саркомы Рауса (RSV), промотора дигидрофолатредуктазы и промотора 13-актина. В некоторых вариантах осуществления гетерологичная нуклеиновая кислота функционально связана с промотором, подходящим для экспрессии терапевтического полипептида или терапевтической нуклеиновой кислоты в одной или нескольких клетках CNS. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько клеток CNS включают в себя одну или несколько клеток головного мозга. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько клеток CNS представляют собой олигодендроцит, астроцит, нейрон, клетку паренхимы головного мозга, клетку микроглии, клетку эпендимы и/или клетку Пуркинье.

В некоторых вариантах осуществления вышеприведенных аспектов и вариантов осуществления вектор на основе gAAV представляет собой самокомплементарный вектор на основе gAAV. В некоторых вариантах осуществления вектор содержит первую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую гетерологичную нуклеиновую кислоту, и вторую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую комплементарную последовательность нуклеиновой кислоты, где первая последовательность нуклеиновой кислоты может образовывать внутрицепочечные пары оснований со второй последовательностью нуклеиновой кислоты вдоль большей части или всей ее длины. В некоторых вариантах осуществления первая последовательность нуклеиновой кислоты и вторая последовательность нуклеиновой кислоты соединены мутантным ITR AAV, где мутантный ITR AAV характеризуется делецией D-области и характеризуется мутацией последовательности концевой разрешения.

В некоторых вариантах осуществления вышеприведенных аспектов и вариантов осуществления индивидуум является человеком.

В некоторых вариантах осуществления вышеприведенных аспектов и вариантов осуществления частицы gAAV находятся в композиции. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит буфер и/или фармацевтически приемлемый наполнитель. В некоторых вариантах осуществления набор с частицей gAAV дополнительно содержит инструкции по доставке композиции на основе частиц gAAV в CNS. В некоторых вариантах осуществления набор с частицей gAAV дополнительно содержит инструкции по доставке композиции на основе частиц gAAV в полосатое тело.

В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает частицу gAAV, содержащую капсидный белок AAVrh8R, где капсидный белок AAVrh8R содержит одну или несколько аминокислотных замен, где одна или несколько аминокислотных замен усиливают связывание частицы gAAV с гепарансульфатсодержащим протеогликаном по сравнению с частицей AAV, содержащей капсидный белок AAVrh8R дикого типа, или где одна или несколько аминокислотных замен находятся в одном или нескольких положениях, соответствующих аминокислотам 484, 487, 527, 532, 585 или 588, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAV2. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен усиливают связывание частицы gAAV с гепарансульфатсодержащим протеогликаном приблизительно по меньшей мере на 10%, приблизительно по меньшей мере на 25%, приблизительно по меньшей мере на 50%, приблизительно по меньшей мере на 75% или приблизительно по меньшей мере на 100%. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная замена находится в положении 586, нумерация которого приведена согласно нумерации VP1 AAVrh8R. В некоторых вариантах осуществления нумерация приведена по VP1 AAVrh8R, содержащему аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная замена включает замену в положении A586, нумерация которого приведена согласно VP1 AAVrh8R. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная замена включает замены A586R или A586K, нумерация которых приведена согласно VP1 AAVrh8R. В некоторых вариантах осуществления частица gAAV содержит капсидный белок gAAV с SEQ ID NO: 10.

В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает способ усиления связывания частицы gAAV, содержащей капсидный белок AAVrh8R, с гепарансульфатсодержащим протеогликаном, включающий введение одной или нескольких аминокислотных замен в капсидный белок, где одна или несколько аминокислотных замен усиливают связывание частицы gAAV с гепарансульфатсодержащим протеогликаном по сравнению с частицей AAV, содержащей капсидный белок AAVrh8R дикого типа. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен усиливают связывание частицы gAAV с гепарансульфатсодержащим протеогликаном приблизительно по меньшей мере на 10%, приблизительно по меньшей мере на 25%, приблизительно по меньшей мере на 50%, приблизительно по меньшей мере на 75% или приблизительно по меньшей мере на 100%. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная замена находится в положении 586, нумерация которого приведена согласно нумерации VP1 AAVrh8R. В некоторых вариантах осуществления нумерация приведена по VP1 AAVrh8R, содержащему аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная замена включает замену в положении A586, нумерация которого приведена согласно VP1 AAVrh8R. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная замена включает замены A586R или A586K, нумерация которых приведена согласно VP1 AAVrh8R. В некоторых вариантах осуществления частица gAAV содержит капсидный белок gAAV с SEQ ID NO: 10.

В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает способ доставки гетерологичной нуклеиновой кислоты в сетчатку индивидуума, включающий интравитреальное введение частицы рекомбинантного аденоассоциированного вируса (gAAV) индивидууму, где частица gAAV содержит а) капсид gAAV, содержащий капсидные белки gAAV, содержащие одну или несколько аминокислотных замен в одном или нескольких положениях, в которых происходит взаимодействие с гепарансульфатсодержащим протеогликаном, или в одном или нескольких положениях, соответствующих аминокислотам 484, 487, 527, 532, 585 или 588, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAV2, и б) вектор на основе gAAV, содержащий гетерологичную нуклеиновую кислоту и по меньшей мере один инвертированный концевой повтор AAV. В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает способ улучшения трансдукции клеток, опосредованной gAAV, после интравитреальной доставки частицы

гAAV в глаз индивидуума по сравнению с трансдукцией клеток, опосредованной гAAV, содержащим капсид дикого типа, при этом способ включает внедрение одной или нескольких аминокислотных замен в капсидный белок AAV в одно или несколько положений, в которых происходит взаимодействие с гепарансульфатсодержащим протеогликаном, или в одно или несколько положений, соответствующих аминокислотам 484, 487, 527, 532, 585 или 588, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAV2; где частица гAAV содержит капсидный белок гAAV и вектор на основе гAAV, содержащий гетерологичную нуклеиновую кислоту и по меньшей мере один концевой повтор AAV. В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает способ улучшения экспрессии гетерологичной нуклеиновой кислоты после интравитреальной доставки частиц гAAV в глаз индивидуума, при этом способ включает внедрение одной или нескольких аминокислотных замен в капсидный белок AAV в одно или несколько положений, в которых происходит взаимодействие с гепарансульфатсодержащим протеогликаном, или в одно или несколько положений, соответствующих аминокислотам 484, 487, 527, 532, 585 или 588, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAV2; где частица гAAV содержит капсидный белок гAAV и вектор на основе гAAV, содержащий гетерологичную нуклеиновую кислоту и по меньшей мере один концевой повтор AAV. В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает способ лечения глазного нарушения у индивидуума, включающий интравитреальную доставку композиции, содержащей частицы гAAV, в сетчатку индивидуума, где частицы гAAV содержат а) капсид гAAV, содержащий капсидный белок гAAV, содержащий одну или несколько аминокислотных замен в одном или нескольких положениях, в которых происходит взаимодействие с гепарансульфатсодержащим протеогликаном, или в одном или нескольких положениях, соответствующих аминокислотам 484, 487, 527, 532, 585 или 588, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAV2, и б) вектор на основе гAAV, содержащий гетерологичную нуклеиновую кислоту и по меньшей мере один концевой повтор AAV. В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает систему для интравитреальной доставки вектора в глаз индивидуума, содержащую: а) композицию, содержащую эффективное количество частиц гAAV, где i) капсидный белок частиц гAAV содержит одну или несколько аминокислотных замен в одном или нескольких положениях, в которых происходит взаимодействие с гепарансульфатсодержащим протеогликаном, или в одном или нескольких положениях, соответствующих аминокислотам 484, 487, 527, 532, 585 или 588, и ii) вектор содержит гетерологичную нуклеиновую кислоту, кодирующую терапевтический полипептид или терапевтическую РНК, и по меньшей мере один концевой повтор AAV; и б) устройство для интравитреальной доставки гAAV. В некоторых вариантах осуществления частица гAAV содержит капсид вируса серотипа AAVrh8R, AAV1, AAV6, AAV8, AAV9 или AAVrh10. В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает набор для лечения глазного нарушения, содержащий: а) композицию, содержащую частицы гAAV, где частица гAAV содержит i) капсид гAAV, содержащий капсидные белки гAAV, содержащие одну или несколько аминокислотных замен в одном или нескольких положениях, в которых происходит взаимодействие с гепарансульфатсодержащим протеогликаном, или в одном или нескольких положениях, соответствующих аминокислотам 484, 487, 527, 532, 585 или 588, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAV2, и ii) вектор на основе гAAV, содержащий гетерологичную нуклеиновую кислоту для лечения глазного нарушения и по меньшей мере один инвертированный концевой повтор AAV; и б) фармацевтический наполнитель, подходящий для интравитреального введения. В некоторых вариантах осуществления частица гAAV содержит капсид AAVrh8R, AAV1, AAV6, AAV8, AAV9 или AAVrh10. В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает частицу гAAV, содержащую капсидный белок AAV1, где капсидный белок AAV1 содержит одну или несколько аминокислотных замен, где одна или несколько аминокислотных замен повышают эффективность трансдукции клетки в глазу частицей гAAV по сравнению с частицей AAV, содержащей капсидный белок AAV1 дикого типа, или где одна или несколько аминокислотных замен находятся в одном или нескольких положениях, соответствующих аминокислотам 484, 487, 527, 532, 585 или 588, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAV2. В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает частицу гAAV, содержащую капсидный белок AAV6, где капсидный белок AAV6 содержит одну или несколько аминокислотных замен, где одна или несколько аминокислотных замен повышают эффективность трансдукции клетки в глазу частицей гAAV по сравнению с частицей AAV, содержащей капсидный белок AAV6 дикого типа, или где одна или несколько аминокислотных замен находятся в одном или нескольких положениях, соответствующих аминокислотам 484, 487, 527, 532, 585 или 588, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAV2. В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает частицу гAAV, содержащую капсидный белок AAV8, где капсидный белок AAV8 содержит одну или несколько аминокислотных замен, где одна или несколько аминокислотных замен повышают эффективность трансдукции клетки в глазу частицей гAAV по сравнению с частицей AAV, содержащей капсидный белок AAV8 дикого типа, или где одна или несколько аминокислотных замен находятся в одном или нескольких положениях, соответствующих аминокислотам 484, 487, 527, 532, 585 или 588, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAV2. В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает частицу гAAV, содержащую капсидный белок AAV9, где капсидный белок AAV9 содержит одну или несколько аминокислотных замен, где одна или несколько аминокислотных замен повышают эффективность трансдукции клетки в глазу

частицей gAAV по сравнению с частицей AAV, содержащей капсидный белок AAV9 дикого типа, или где одна или несколько аминокислотных замен находятся в одном или нескольких положениях, соответствующих аминокислотам 484, 487, 527, 532, 585 или 588, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAV2. В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает частицу gAAV, содержащую капсидный белок AAVrh10, где капсидный белок AAVrh10 содержит одну или несколько аминокислотных замен, где одна или несколько аминокислотных замен повышают эффективность трансдукции клетки в глазу частицей gAAV по сравнению с частицей AAV, содержащей капсидный белок AAVrh10 дикого типа, или где одна или несколько аминокислотных замен находятся в одном или нескольких положениях, соответствующих аминокислотам 484, 487, 527, 532, 585 или 588, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAV2. В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает частицу gAAV, содержащую капсидный белок AAV3, где капсидный белок AAV3 содержит одну или несколько аминокислотных замен в одном или нескольких положениях, соответствующих аминокислотам 484, 487, 527, 532, 585 или 588, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAV2. В некоторых вариантах осуществления частица gAAV содержит капсид AAV1, капсид AAV2, капсид AAV3, капсид AAV6, капсид AAV8, капсид AAVrh8R, капсид AAV9 или капсид AAVrh10. В некоторых вариантах осуществления эффективность трансдукции повышена по меньшей мере на приблизительно 10%, по меньшей мере на приблизительно 25%, по меньшей мере на приблизительно 50%, по меньшей мере на приблизительно 75% или по меньшей мере на приблизительно 100%.

В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен усиливают связывание частицы gAAV с гепарансульфатсодержащим протеогликаном. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен усиливают связывание частицы gAAV с гепарансульфатсодержащим протеогликаном приблизительно по меньшей мере на 10%, приблизительно по меньшей мере на 25%, приблизительно по меньшей мере на 50%, приблизительно по меньшей мере на 75% или приблизительно по меньшей мере на 100%. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен повышают эффективность трансдукции клетки в глазу или центральной нервной системе частицей gAAV по сравнению с частицей AAV, содержащей капсидный белок AAVrh8R дикого типа, приблизительно по меньшей мере на 10%, приблизительно по меньшей мере на 25%, приблизительно по меньшей мере на 50%, приблизительно по меньшей мере на 75% или приблизительно по меньшей мере на 100%. В некоторых вариантах осуществления клетка глаза представляет собой клетку сетчатки, фоторецепторную клетку, клетки пигментного эпителия сетчатки, биполярные клетки, горизонтальные клетки, амакриновые клетки, клетки Мюллера и/или ганглионарные клетки. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену аминокислотного остатка, который не является положительно заряженным, на положительно заряженный аминокислотный остаток. В некоторых вариантах осуществления гидрофобный аминокислотный остаток замещен положительно заряженным аминокислотным остатком. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену аргининовым или лизиновым остатком. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену аланинового, серинового, глутаминового или треонинового остатка аргининовым или лизиновым остатком. В некоторых вариантах осуществления частица gAAV содержит капсид AAV серотипа rh8R (AAVrh8R). В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен находятся в положениях 586 и/или 589, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAVrh8R. В некоторых вариантах осуществления нумерация приведена по VP1 AAVrh8R, содержащему аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену в положениях A586 и/или T589, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAVrh8R. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замены A586R или A586K, нумерация для которых приведена согласно VP1 AAVrh8R. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замены T589R или T589K, нумерация для которых приведена согласно VP1 AAVrh8R. В некоторых вариантах осуществления частица gAAV содержит капсид AAV серотипа 1 (AAV1). В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен находятся в положениях 586 и/или 589, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAV1. В некоторых вариантах осуществления VP1 AAV1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену в положениях S586 и/или T589, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAV1. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замены S586R или S586K, нумерация для которых приведена согласно VP1 AAV1. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замены T589R или T589K, нумерация для которых приведена согласно VP1 AAV1. В некоторых вариантах осуществления частица gAAV содержит капсид AAV серотипа 6 (AAV6). В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен находятся в положениях 586 и/или 589, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAV6. В некоторых вариантах осуществления нумерация приведена согласно VP1 AAV6, содержащему аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен

включают замену в положениях S586 и/или T589, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAV6. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену S586R, нумерация для которых приведена согласно VP1 AAV6. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замены T589R или T589K, нумерация для которых приведена согласно VP1 AAV6. В некоторых вариантах осуществления частица gAAV содержит капсид AAV серотипа 8 (AAV8). В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен находятся в положениях 588 и/или 591, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAV8. В некоторых вариантах осуществления VP1 AAV8 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену в положениях Q588 и/или T591, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAV8. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замены Q588R или Q588K, нумерация для которых приведена согласно VP1 AAV8. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену T591R, нумерация для которой приведена согласно VP1 AAV8. В некоторых вариантах осуществления частица gAAV содержит капсид AAV серотипа 9 (AAV9). В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен находятся в положениях 586 и/или 589, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAV9. В некоторых вариантах осуществления VP1 AAV9 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 15. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену в положениях S586 и/или A589, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAV9. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замены S586R или S586K, нумерация для которых приведена согласно VP1 AAV9. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замены A589R или A589K, нумерация для которых приведена согласно VP1 AAV9. В некоторых вариантах осуществления частица gAAV содержит капсид AAV серотипа rh10 (AAVrh10). В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен находятся в положениях 588 и/или 591, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAVrh10. В некоторых вариантах осуществления VP1 AAVrh10 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 16. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену в положениях Q588 и/или A591, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAVrh10. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замены Q588R или Q588K, нумерация для которых приведена согласно VP1 AAVrh10. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замены A591R или A591K, нумерация для которых приведена согласно VP1 AAVrh10. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает частицу gAAV, содержащую капсидный белок AAV3, при этом капсидный белок AAV3 содержит одну или несколько аминокислотных замен в одном или нескольких положениях, соответствующих аминокислотам 484, 487, 527, 532, 585 или 588, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAV2. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен повышают эффективность трансдукции клетки в глазу или центральной нервной системе частицей gAAV по сравнению с частицей AAV, содержащей капсидный белок AAVrh8R дикого типа, приблизительно по меньшей мере на 10%, приблизительно по меньшей мере на 25%, приблизительно по меньшей мере на 50%, приблизительно по меньшей мере на 75% или приблизительно по меньшей мере на 100%. В некоторых вариантах осуществления частица gAAV содержит капсид AAV1, капсид AAV2, капсид AAV3, капсид AAV6, капсид AAV8, капсид AAVrh8R, капсид AAV9 или капсид AAVrh10. В некоторых вариантах осуществления гетерологичная нуклеиновая кислота кодирует терапевтический полипептид или терапевтическую нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления гетерологичная нуклеиновая кислота кодирует полипептид, выбранный из группы, состоящей из антиоксиданта, нейротрофического фактора, антиапоптозного фактора, антиангиогенного фактора и противовоспалительного фактора. В дополнительных вариантах осуществления гетерологичная нуклеиновая кислота кодирует полипептид, выбранный из группы, состоящей из Prph2, RPE65, APLP1, GUCY2D, LCA5, CRX, CEP290, MYO 7a, кларина, ABCA4, RDH12, IMPDH1, CRB1, LRAT, NMNAT1, TULP1, MERTK, RPGR, RP2, RPGRIP, CNGA3, CNGB3, GNAT2, GDNF, CNTF, FGF2, PEDF, EPO, BCL2, BCL-X, NFkB, эндостатина, ангиостатина, sFlt, sPDGF-R, IL10, антитела к IL17, sIL17R, IL1-RA, антитела к TGFb, sTNF-R I, sTNF-R II и IL4. В других вариантах осуществления гетерологичная нуклеиновая кислота кодирует терапевтическую нуклеиновую кислоту. В дополнительных вариантах осуществления терапевтическая нуклеиновая кислота представляет собой siRNA, shRNA, средство для RNAi, miRNA, антисмысловую РНК, рибозим или ДНК-фермент. В некоторых вариантах осуществления вектор на основе gAAV представляет собой самокомплементарный вектор на основе gAAV. В некоторых вариантах осуществления частицы AAV по настоящему изобретению содержат капсид, содержащий одну или несколько аминокислотных замен, которые изменяют связывание с HSPG (например, ослабляют или устраняют связывание с HSPG) или находятся в одном или нескольких положениях, соответствующих аминокислотам 484, 487, 527, 532, 585 или 588, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAV2, и гетерологичную нуклеиновую кислоту, кодирующую терапевтический полипептид или терапевтическую нуклеиновую кислоту, где гетерологичная

нуклеиновая кислота находится под контролем промоторной последовательности, обеспечивающей экспрессию в сетчатке. В некоторых вариантах осуществления гетерологичная нуклеиновая кислота функционально связана с промотором, подходящим для экспрессии терапевтического полипептида или терапевтической нуклеиновой кислоты в одном или нескольких типах клеток сетчатки. В некоторых вариантах осуществления клетка сетчатки представляет собой фоторецепторную клетку, клетки пигментного эпителия сетчатки, биполярные клетки, горизонтальные клетки, амакриновые клетки, клетки Мюллера и/или ганглионарные клетки. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой промотор родопсинкиназы (RK), промотор опсина, промотор цитомегаловируса (CMV), промотор β -актина курицы (CBA). В некоторых вариантах осуществления индивидуум является человеком. В некоторых вариантах осуществления гетерологичную нуклеиновую кислоту применяют для лечения глазного нарушения, выбранного из группы, состоящей из аутосомно-рецессивной тяжелой дегенерации сетчатки с ранним началом (врожденного амавроза Лебера), врожденной ахроматопсии, болезни Штаргардта, болезни Беста, болезни Дойна, колбочковой дистрофии, пигментной дистрофии сетчатки, X-сцепленного ретиношизиса, синдрома Ашера, возрастной макулярной дегенерации, атрофической формы возрастной макулярной дегенерации, неоваскулярной формы AMD, диабетической макулопатии, пролиферативной диабетической ретинопатии (PDR), кистозного макулярного отека, центральной серозной ретинопатии, отслоения сетчатки, внутриглазного воспаления, глаукомы и заднего увеита. В некоторых вариантах осуществления вектор на основе gAAV представляет собой самокомплементарный вектор на основе gAAV. В некоторых вариантах осуществления вектор содержит первую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую гетерологичную нуклеиновую кислоту, и вторую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую комплементарную последовательность нуклеиновой кислоты, где первая последовательность нуклеиновой кислоты может образовывать внутрицепочечные пары оснований со второй последовательностью нуклеиновой кислоты вдоль большей части или всей ее длины. В некоторых вариантах осуществления первая последовательность нуклеиновой кислоты и вторая последовательность нуклеиновой кислоты соединены мутантным ITR AAV, где мутантный ITR AAV характеризуется делецией D-области и характеризуется мутацией последовательности концевой разрешения. В некоторых вариантах осуществления индивидуум является человеком. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен повышают эффективность трансдукции клетки в глазу или центральной нервной системе частицей gAAV по сравнению с частицей AAV, содержащей капсидный белок AAVrh8R дикого типа, приблизительно по меньшей мере на 10%, приблизительно по меньшей мере на 25%, приблизительно по меньшей мере на 50%, приблизительно по меньшей мере на 75% или приблизительно по меньшей мере на 100%.

Все литературные источники, цитируемые в данном документе, в том числе патентные заявки и публикации, включены посредством ссылки во всей своей полноте.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 указаны остатки капсида, вовлеченные в связывание с гепарансульфатсодержащим протеогликаном, и мутации, введенные для получения мутантной формы AAV2 HBKO. Нумерация приведена по аминокислотной последовательности VP1.

На фиг. 2 показано снижение уровня трансдукции клеток 293 в культуре, наблюдаемое для частиц мутантной формы AAV2 HBKO (AAV2 HBKO CBA-sFLT02), по сравнению с частицами AAV2 дикого типа (AAV2 CBA-sFLT02). Трансдукцию анализировали путем измерения количества растворимого Flt (sFLT), присутствующего в среде для культивирования клеток через 48 ч после инъекции частиц AAV2 дикого типа или мутантной формы HBKO, несущих векторы, в которых применяется промотор CBA для управления экспрессией Flt.

На фиг. 3 показано снижение уровня трансдукции клеток 293 и HeLa в культуре, наблюдаемое для частиц мутантной формы AAV2 HBKO (AAV2 HBKO CBA-GFP), по сравнению с частицами AAV2 дикого типа (AAV2 CBA-GFP). Трансдукцию анализировали путем флуоресцентной визуализации клеток, проводимой через 48 ч после инъекции частиц AAV2 дикого типа или мутантной формы HBKO, несущих векторы, в которых применяется промотор CBA для управления экспрессией EGFP.

На фиг. 4А и 4В показана трансдукция, наблюдаемая при интравитреальной (фиг. 4А) или субретинальной (фиг. 4В) инъекции частиц AAV2 дикого типа или мутантной формы AAV2 HBKO. Трансдукцию анализировали по экспрессии растворимого Flt (sFLT) после трансдукции векторами, кодирующими Flt. Для каждого эксперимента указано количество геномов векторов, введенных путем инъекции (10^8 или 10^9 vg).

На фиг. 5 показано, что частицы мутантной формы AAV2 HBKO неспособны осуществлять трансдукцию в глазу мыши после интравитреальной инъекции. Мышам давали интравитреальную инъекцию частиц AAV2 дикого типа (AAV2 CBA-GFP) или мутантной формы HBKO (AAV2 HBKO CBA-GFP), несущих векторы, в которых применяется промотор CBA для управления экспрессией EGFP, и срезы визуализировали с помощью флуоресцентной микроскопии.

На фиг. 6 показано, что частицы мутантной формы AAV2 HBKO (AAV2 CBA HBKO) вызывают значительное повышение трансдукции после субретинальной инъекции по сравнению с частицами дикого типа (AAV2 CBA). Трансдукцию анализировали по экспрессии растворимого Flt (sFLT) после инъек-

ции частиц AAV2, несущих векторы, в которых применяется промотор CBA для управления экспрессией Flt. Указано количество геномов векторов, введенных путем инъекции (10^8 или 10^9 vg).

На фиг. 7 показано, что частицы мутантной формы AAV2 HBKO (AAV2 HBKO CBA-GFP) вызывают значительное повышение трансдукции фоторецепторных клеток (как отмечено) после субретинальной инъекции по сравнению с частицами дикого типа (AAV2 CBA-GFP). Трансдукцию измеряли путем флуоресцентной визуализации экспрессии GFP после трансдукции частицами AAV2, несущими векторы, в которых применяется промотор CBA для управления экспрессией EGFP.

На фиг. 8 показано, что частицы мутантной формы AAV2 HBKO (AAV2 RK HBKO) вызывают значительное повышение трансдукции фоторецепторов после субретинальной инъекции по сравнению с частицами дикого типа (AAV2 RK). Трансдукцию анализировали по экспрессии растворимого Flt (sFLT) после инъекции частиц AAV2, несущих векторы, в которых применяется промотор родопсинкиназы (RK) для управления экспрессией Flt. Указано количество геномов векторов, введенных путем инъекции (10^8 или 10^9 vg).

На фиг. 9A и 9B показана экспрессия EGFP в головном мозге мыши через 30 дней после интратриарной инъекции AAV2HBKO-EGFP (фиг. 9A) по сравнению с AAV2-EGFP (фиг. 9B) у мышей дикого типа. На каждой панели экспрессия EGFP управлялась промотором CBA и визуализировалась с помощью флуоресцентной микроскопии.

На фиг. 10A и 10B показана экспрессия GFP в головном мозге мыши через 30 дней после интратриарной инъекции AAV2HBKO-miRNA-Htt-GFP (фиг. 10A) по сравнению с AAV1-miRNA-Htt-GFP (фиг. 10B) у мышей YAC128 с HD. Векторы miRNA-Htt-GFP относятся к конструкциям, экспрессирующим искусственную miRNA, нацеленную на Htt человека, и репортерный GFP. На каждой панели экспрессия GFP управлялась промотором CBA и визуализировалась с помощью флуоресцентной микроскопии при трех различных увеличениях ($4\times$, $10\times$ и $20\times$, как отмечено).

На фиг. 11A показан анализ уровней мРНК НТТ человека в биоптатах полосатого тела головного мозга мыши по методу qPCR через 30 дней после инъекции AAV1-miRNA-Htt и AAV2HBKO-miRNA-Htt по сравнению с необработанными контролями.

На фиг. 11B показан анализ уровней белка Htt человека в биоптатах коры головного мозга мыши по методу вестерн-блоттинга через 30 дней после инъекции AAV1-miRNA-Htt и AAV2HBKO-miRNA-Htt по сравнению с необработанными контролями.

На фиг. 12A-C показана экспрессия Iba1 в полосатом теле мышей YAC128 через 30 дней после инъекции AAV2HBKO-miRNA-Htt-GFP (фиг. 12B) или AAV1-miRNA-Htt-GFP (фиг. 12C) по сравнению с необработанными контролями (фиг. 12A).

На фиг. 13A-C показана экспрессия GFP в полосатом теле мышей YAC128 через 30 дней после инъекции AAV2HBKO-miRNA-Htt-GFP (фиг. 13B) или AAV1-miRNA-Htt-GFP (фиг. 13C) по сравнению с необработанными контролями (фиг. 13A).

На фиг. 14 показано сравнение остатков капсидов, вовлеченных в связывание с гепарансульфатсодержащим протеогликаном, между капсидами AAV2 и AAVrh8R. Нумерация приведена по аминокислотной последовательности VP1.

На фиг. 15 показано выравнивание аминокислот AAV2 и AAVrh8R по остаткам, отвечающим за связывание AAV2 с гепараном. Положения аргининовых модификаций капсида AAVrh8R обведены кружком.

На фиг. 16A показана улучшенная трансдукция клеток HeLa *in vitro*, которой характеризуется AAVrh8R с мутацией A586R, по сравнению с AAVrh8R дикого типа. Трансдукцию отслеживали по sFLT02 в культуральной среде через 48 ч после инфицирования векторами на основе AAVrh8R или AAVrh8R с аргининовой модификацией.

На фиг. 16B показана ослабленная трансдукция клеток HeLaRC32 *in vitro*, которой характеризуется AAVrh8R с мутацией R533A, по сравнению с AAVrh8R дикого типа. Трансдукцию отслеживали по sFLT02 в культуральной среде через 48 ч после инфицирования векторами на основе AAVrh8R или AAVrh8R с аргининовой модификацией.

На фиг. 17A-D показаны уровни трансдукции *in vitro*, которыми характеризуются AAVrh8R с мутациями A586R и R533A, по сравнению с AAVrh8R дикого типа. AAVrh8R с мутацией A586R (фиг. 17B) демонстрирует повышенный уровень трансдукции клеток NS1 *in vitro* по сравнению с AAVrh8R дикого типа (фиг. 17A). AAVrh8R с мутацией R533A (фиг. 17D) демонстрирует сниженный уровень трансдукции клеток HeLa *in vitro* по сравнению с AAVrh8R дикого типа (фиг. 17C). Трансдукцию отслеживали по экспрессии EGFP в клетках через 48 ч после инфицирования векторами на основе AAVrh8R или AAVrh8R с аргининовой модификацией.

На фиг. 18A и 18B показаны уровни субретинальной трансдукции у мышей C57B16, которыми характеризуются AAVrh8R с мутациями A586R и R533A (фиг. 18A) AAVrh8R с мутацией A586R демонстрирует сниженный уровень субретинальной трансдукции по сравнению с AAVrh8R дикого типа. Также тестировали вектор на основе AAV2. (фиг. 18B) AAVrh8R с мутацией R533A демонстрирует повышенный уровень субретинальной трансдукции по сравнению с AAVrh8R дикого типа и ранее не подвергавшимися обработке мышами. Трансдукцию отслеживали по sFLT02 в лизатах сетчатки мышей C57B16

через 30 дней после субретинального введения векторов на основе AAVrh8R или AAVrh8R с аргининовой модификацией.

На фиг. 19 показаны уровни sFLT02 в лизатах сетчатки мышей C57B16 через 30 дней после интравитреального введения векторов на основе AAV2, AAVrh8R или AAVrh8R-A586R.

На фиг. 20 показано выравнивание аминокислот по остаткам, отвечающим за связывание AAV2 с гепараном, с AAVrh8R, AAV1, AAV6, AAV8, AAV9 и AAVrh10.

Подробное описание

Как описано в данном документе, авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что частицы гAAV с модификациями, соответствующими аминокислотам 484, 487, 532, 585 и/или 588, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAV2, демонстрируют повышение уровня трансдукции клеток после введения в глаз или CNS субъекта. Не желая ограничиваться какой-либо теорией, полагают, что эти частицы гAAV характеризуются ослабленным или устраненным связыванием с HSPG или имеют модифицированный заряд на поверхности капсида, так что введение частиц гAAV приводит к повышению уровня трансдукции клеток в глазу или CNS субъекта. Настоящее изобретение, таким образом, предусматривает способы доставки гетерологичной нуклеиновой кислоты в глаз или CNS индивидуума, включающие введение частицы рекомбинантного аденоассоциированного вируса (гAAV) в глаз или CNS индивидуума, где частица гAAV содержит а) капсид гAAV, содержащий капсидные белки гAAV, содержащие одну или несколько аминокислотных замен в одном или нескольких положениях, в которых происходит взаимодействие с гепарансульфатсодержащим протеогликаном, и б) вектор на основе гAAV, содержащий гетерологичную нуклеиновую кислоту и по меньшей мере один инвертированный концевой повтор AAV. В некоторых вариантах осуществления аминокислотные замены приводят к ослаблению или устранению связывания с HSPG.

В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает способы доставки гетерологичной нуклеиновой кислоты в глаз индивидуума, включающие введение частицы рекомбинантного аденоассоциированного вируса (гAAV) в субретинальную область индивидуума, где частица гAAV содержит а) капсид гAAV, содержащий капсидные белки гAAV, содержащие одну или несколько аминокислотных замен в одном или нескольких положениях, в которых происходит взаимодействие с гепарансульфатсодержащим протеогликаном, и б) вектор на основе гAAV, содержащий гетерологичную нуклеиновую кислоту и по меньшей мере один инвертированный концевой повтор AAV.

В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает способы улучшения трансдукции клеток, опосредованной гAAV, после субретинальной доставки частицы гAAV в глаз индивидуума по сравнению с трансдукцией клеток, опосредованной гAAV, содержащим капсид дикого типа, при этом способ включает внедрение одной или нескольких аминокислотных замен в капсидный белок AAV в одно или несколько положений, в которых происходит взаимодействие с гепарансульфатсодержащим протеогликаном; где частица гAAV содержит капсидный белок гAAV и вектор на основе гAAV, содержащий гетерологичную нуклеиновую кислоту и по меньшей мере один концевой повтор AAV. В некоторых вариантах осуществления аминокислотные замены приводят к ослаблению или устранению связывания с HSPG. В некоторых вариантах осуществления частицы гAAV содержат капсид, содержащий замены R585A и R588A в гAAV2, нумерация для которых приведена согласно VP1 AAV2 (SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления частицы гAAV содержат капсид, содержащий замены A586R и/или R533A в AAVrh8R, нумерация для которых приведена согласно VP1 AAVrh8R (SEQ ID NO: 9).

В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает способы улучшения экспрессии гетерологичной нуклеиновой кислоты после субретинальной доставки частиц гAAV в глаз индивидуума, при этом способ включает внедрение одной или нескольких аминокислотных замен в капсидный белок AAV в одно или несколько положений, в которых происходит взаимодействие с гепарансульфатсодержащим протеогликаном; где частица гAAV содержит капсидный белок гAAV и вектор на основе гAAV, содержащий гетерологичную нуклеиновую кислоту и по меньшей мере один концевой повтор AAV. В некоторых вариантах осуществления аминокислотные замены приводят к ослаблению или устранению связывания с HSPG. В некоторых вариантах осуществления частицы гAAV содержат капсид, содержащий замены R585A и R588A в гAAV2, нумерация для которых приведена согласно VP1 AAV2 (SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления частицы гAAV содержат капсид, содержащий замены A586R и/или R533A в AAVrh8R, нумерация для которых приведена согласно VP1 AAVrh8R (SEQ ID NO: 9).

В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает способы улучшения экспрессии гетерологичной нуклеиновой кислоты после субретинальной доставки частиц гAAV в глаз индивидуума, при этом способ включает внедрение одной или нескольких аминокислотных замен в капсидный белок AAV в одно или несколько положений, в которых происходит взаимодействие с гепарансульфатсодержащим протеогликаном; где частица гAAV содержит капсидный белок гAAV и вектор на основе гAAV, содержащий гетерологичную нуклеиновую кислоту и по меньшей мере один концевой повтор AAV. Улучшение трансдукции определяют по сравнению с частицами гAAV, содержащими капсид дикого типа. В некоторых вариантах осуществления аминокислотные замены приводят к ослаблению или устранению связывания с HSPG. В некоторых вариантах осуществления частицы гAAV содержат капсид, содер-

жащий замены R585A и R588A в капсиде gAAV2, нумерация для которых приведена согласно VP1 AAV2 (SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления частицы gAAV содержат капсид, содержащий замены A586R и/или R533A в AAVrh8R, нумерация для которых приведена согласно VP1 AAVrh8R (SEQ ID NO: 9).

В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает способы лечения глазного нарушения у индивидуума, включающие доставку композиции, содержащей эффективное количество частиц gAAV, в сетчатку индивидуума, где частицы gAAV содержат а) капсид gAAV, содержащий капсидный белок gAAV, содержащий одну или несколько аминокислотных замен в одном или нескольких положениях, в которых происходит взаимодействие с гепарансульфатсодержащим протеогликаном, и б) вектор на основе gAAV, содержащий гетерологичную нуклеиновую кислоту и по меньшей мере один концевой повтор AAV. В некоторых вариантах осуществления аминокислотные замены приводят к ослаблению или устранению связывания с HSPG. В некоторых вариантах осуществления частицы gAAV содержат капсид, содержащий замены R585A и R588A в gAAV2, нумерация для которых приведена согласно VP1 AAV2 (SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления частицы gAAV содержат капсид, содержащий замены A586R и/или R533A в AAVrh8R, нумерация для которых приведена согласно VP1 AAVrh8R (SEQ ID NO: 9).

Настоящее изобретение также предусматривает системы для субретинальной доставки вектора в глаз индивидуума, содержащие а) композицию, содержащую эффективное количество частиц gAAV, где i) капсидный белок частиц gAAV содержит одну или несколько аминокислотных замен в одном или нескольких положениях, в которых происходит взаимодействие с гепарансульфатсодержащим протеогликаном, и ii) вектор содержит гетерологичную нуклеиновую кислоту, кодирующую терапевтический полипептид или терапевтическую РНК, и по меньшей мере один концевой повтор AAV; и б) устройство для доставки gAAV в сетчатку. В некоторых вариантах осуществления аминокислотные замены приводят к ослаблению или устранению связывания с HSPG. В некоторых вариантах осуществления частицы gAAV содержат капсид, содержащий замены R585A и R588A в gAAV2, нумерация для которых приведена согласно VP1 AAV2 (SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления частицы gAAV содержат капсид, содержащий замены A586R и/или R533A в AAVrh8R, нумерация для которых приведена согласно VP1 AAVrh8R (SEQ ID NO: 9).

В некоторых аспектах настоящее изобретение дополнительно предусматривает способы доставки гетерологичной нуклеиновой кислоты в центральную нервную систему (CNS) индивидуума, включающие введение частицы рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV) в CNS индивидуума. Частица gAAV содержит (а) капсид gAAV, содержащий капсидные белки gAAV, содержащие одну или несколько аминокислотных замен в одном или нескольких положениях, в которых происходит взаимодействие с гепарансульфатсодержащим протеогликаном, и (б) вектор на основе gAAV, содержащий гетерологичную нуклеиновую кислоту и по меньшей мере один инвертированный концевой повтор AAV. Эти способы характеризуются улучшенной экспрессией гетерологичной нуклеиновой кислоты и/или трансдукцией клеток, опосредованной gAAV, после доставки частицы gAAV в CNS индивидуума, например, по сравнению с трансдукцией клеток, опосредованной gAAV, содержащим капсид дикого типа. Кроме того, с помощью способов по настоящему изобретению возможно инфицировать конкретные клетки (например, нейроны), при этом по-прежнему достигая широкой и стойкой эффективности трансдукции. Такие частицы gAAV и способы подходят для применения в лечении нарушений со стороны CNS, в том числе, без ограничения, болезни Хантингтона. В некоторых вариантах осуществления аминокислотные замены приводят к ослаблению или устранению связывания с HSPG. В некоторых вариантах осуществления частицы gAAV содержат капсид, содержащий замены R585A и R588A в gAAV2, нумерация для которых приведена согласно VP1 AAV2 (SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления частицы gAAV содержат капсид, содержащий замены A586R и/или R533A в AAVrh8R, нумерация для которых приведена согласно VP1 AAVrh8R (SEQ ID NO: 9).

Настоящее изобретение также предусматривает наборы, содержащие частицы gAAV, или композиции, содержащие частицы gAAV, имеющие (а) капсид gAAV, содержащий капсидные белки gAAV, содержащие одну или несколько аминокислотных замен в одном или нескольких положениях, в которых происходит взаимодействие с гепарансульфатсодержащим протеогликаном, и (б) вектор на основе gAAV, содержащий гетерологичную нуклеиновую кислоту и по меньшей мере один инвертированный концевой повтор AAV. Эти наборы применимы для доставки гетерологичных нуклеиновых кислот в глаз или CNS индивидуума, а также для лечения глазных нарушений или нарушений со стороны CNS у индивидуума (например, для лечения ретинопатии или болезни Хантингтона).

I. Общие методики.

Методики и процедуры, описанные или упоминаемые в данном документе, как правило, широко распространены и обычно используются специалистами в данной области техники с применением традиционной методологии, как, например, широко используемые методики, описанные в Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Sambrook et al., 4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2012); Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel, et al. eds., 2003); серии Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.); PCR 2: A Practical Approach (M.J. MacPherson, B.D. Hames and G.R. Taylor

eds., 1995); Antibodies, A Laboratory Manual (Harlow and Lane, eds., 1988); Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications (R.I. Freshney, 6th ed., J. Wiley and Sons, 2010); Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait, ed., 1984); Methods in Molecular Biology, Humana Press; Cell Biology: A Laboratory Notebook (J.E. Cellis, ed., Academic Press, 1998); Introduction to Cell and Tissue Culture (J.P. Mather and P.E. Roberts, Plenum Press, 1998); Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (A. Doyle, J.B. Griffiths and D.G. Newell, eds., J. Wiley and Sons, 1993-8); Handbook of Experimental Immunology (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds., 1996); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J.M. Miller and M.P. Calos, eds., 1987); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis et al., eds., 1994); Current Protocols in Immunology (J.E. Coligan et al., eds., 1991); Short Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds., J. Wiley and Sons, 2002); Immunobiology (C.A. Janeway et al., 2004); Antibodies (P. Finch, 1997); Antibodies: A Practical Approach (D. Catty, ed., IRL Press, 1988-1989); Monoclonal Antibodies: A Practical Approach (P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); Using Antibodies: A Laboratory Manual (E. Harlow and D. Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); The Antibodies (M. Zanetti and J. D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995) и Cancer: Principles and Practice of Oncology (V.T. DeVita et al., eds., J.B. Lippincott Company, 2011).

II. Определения.

"Вектор", как используется в данном документе, относится к рекомбинантной плазмиде или вирусу, содержащим нуклеиновую кислоту, которую необходимо доставить в клетку-хозяина *in vitro* либо *in vivo*.

Выражение "полинуклеотид" или "нуклеиновая кислота", используемое в данном документе, относится к полимерной форме нуклеотидов, будь то рибонуклеотиды или дезоксирибонуклеотиды, любой длины. Таким образом, данное выражение включает, без ограничения, одно-, двух- или многоцепочечные ДНК или РНК, геномную ДНК, к ДНК гибриды ДНК-РНК или полимер, содержащий пуриновые и пиримидиновые основания или другие природные, химически или биохимически модифицированные, неприродные или дериватизированные нуклеотидные основания. Остов полинуклеотида может содержать сахара и фосфатные группы (которые обычно могут обнаруживаться в РНК или ДНК) или модифицированные либо замещенные сахарные или фосфатные группы. В качестве альтернативы, остов полинуклеотида может включать в себя полимер из синтетических субъединиц, таких как фосфорамидаты, и, таким образом, может представлять собой олигодезоксинуклеозидный фосфорамидат (P-NH₂) или смешанный фосфорамидатно-фосфодиэфирный олигомер. Кроме того, двухцепочечный полинуклеотид можно получить из одноцепочечного полинуклеотидного продукта химического синтеза посредством синтеза комплементарной цепи и отжига цепей в соответствующих условиях либо посредством синтеза комплементарной цепи *de novo* с использованием ДНК-полимеразы с соответствующим праймером.

Выражения "полипептид" и "белок" используются взаимозаменяемо для обозначения полимера из аминокислотных остатков и не ограничены минимальной длиной. Такие полимеры из аминокислотных остатков могут содержать природные или неприродные аминокислотные остатки и включают, без ограничения, пептиды, олигопептиды, димеры, тримеры и мультимеры из аминокислотных остатков. Данным определением охватываются как полноразмерные белки, так и их фрагменты. Выражения включают также постэкспрессионные модификации полипептида, например, гликозилирование, сиаилирование, ацетилирование, фосфорилирование и т.п. Кроме того, для целей настоящего изобретения "полипептид" относится к белку, который содержит модификации, такие как делеции, добавления и замены (обычно консервативные по своей природе), в нативной последовательности при условии, что белок сохраняет желаемую активность. Данные модификации могут быть преднамеренными, как, например, посредством сайт-направленного мутагенеза, или могут быть случайными, как, например, посредством мутаций у хозяев, которые вырабатывают белки, или ошибок, обусловленных ПЦР-амплификацией.

"Рекомбинантный вирусный вектор" относится к рекомбинантному полинуклеотидному вектору, содержащему одну или несколько гетерологичных последовательностей (т.е. последовательность нуклеиновой кислоты невирусного происхождения). В случае рекомбинантных векторов на основе AAV рекомбинантная нуклеиновая кислота фланкирована по меньшей мере одной последовательностью инвертированного концевого повтора (ITR). В некоторых вариантах осуществления рекомбинантная нуклеиновая кислота фланкирована двумя ITR.

"Рекомбинантный вектор на основе AAV (вектор на основе gAAV)" относится к полинуклеотидному вектору, содержащему одну или несколько гетерологичных последовательностей (т.е. последовательностей нуклеиновых кислот, не происходящих из AAV), которые фланкированы по меньшей мере одной последовательностью инвертированного концевого повтора (ITR). Такие векторы на основе gAAV могут реплицироваться и упаковываться в инфекционные вирусные частицы в случае их присутствия в клетке-хозяине, которая была инфицирована подходящим вирусом-помощником (или которая экспрессирует подходящие вспомогательные функциональные элементы) и которая экспрессирует продукты генов *g* и *cap* AAV (т.е. белки Rep и Cap AAV). Если вектор на основе gAAV включен в состав более крупного полинуклеотида (например, в хромосому или в другой вектор, такой как плазмида, применяемая для клонирования или трансфекции), то вектор на основе gAAV можно обозначить как "провектор", который может быть "спасен" посредством репликации и инкапсидирования в присутствии упаковывающих

функциональных элементов и подходящих вспомогательных функциональных элементов AAV. Вектор на основе гAAV может находиться в любой из множества форм, включающих, без ограничения, плазмиды, линейные искусственные хромосомы, образующие комплексы с липидами, инкапсулированные в липосомы и инкапсидированные в вирусную частицу, например, частицу AAV. Вектор на основе гAAV может быть упакован в капсид вируса AAV для получения "частицы рекомбинантного аденоассоциированного вируса (частицы гAAV)".

"Вирус гAAV" или "вирусная частица гAAV" относится к вирусной частице, состоящей из по меньшей мере одного капсидного белка AAV и инкапсидированного генома вектора на основе гAAV.

"Гетерологичный" означает полученный из объекта, генотипически отличающегося от остальной части объекта, с которым его сравнивают или в который его вводят или внедряют. Например, полинуклеотид, введенный посредством методик генетической инженерии в другой тип клетки, является гетерологичным полинуклеотидом (и при экспрессии может кодировать гетерологичный полипептид). Аналогично, клеточная последовательность (например, ген или его часть), внедренная в вирусный вектор, является гетерологичной нуклеотидной последовательностью по отношению к вектору.

Выражение "транскрипция" относится к полинуклеотиду, вводимому в клетку и способному к транскрипции в РНК и необязательно к трансляции и/или экспрессии в соответствующих условиях. В некоторых аспектах он придает желаемое свойство клетке, в которую он был введен, или иным образом приводит к желаемому терапевтическому или диагностическому эффекту. В другом аспекте он может транскрибироваться в молекулу, которая опосредует РНК-интерференцию, такую как miRNA, siRNA или shRNA.

Выражения "геномные частицы (gp)", "геномные эквиваленты" или "копии генома", применяемые в отношении вирусного титра, относятся к числу вирионов, содержащих геном ДНК рекомбинантного AAV, вне зависимости от инфекционности или функциональности. Число геномных частиц в конкретном векторном препарате можно определять с помощью процедур, таких как описанные в примерах в данном документе или, например, в Clark et al. (1999) *Hum. Gene Ther.*, 10:1031-1039; Veldwijk et al. (2002) *Mol. Ther.*, 6:272-278.

Выражение "геном вектора (vg)", используемое в данном документе, может относиться к одному или нескольким полинуклеотидам, содержащим совокупность полинуклеотидных последовательностей вектора, например, вирусного вектора. Геном вектора может быть инкапсидирован в вирусную частицу. В зависимости от конкретного вирусного вектора геном вектора может содержать одноцепочечную ДНК, двухцепочечную ДНК, или одноцепочечную РНК, или двухцепочечную РНК. Геном вектора может содержать эндогенные последовательности, связанные с конкретным вирусным вектором, и/или любые гетерологичные последовательности, встроенные в конкретный вирусный вектор посредством рекомбинантных методик. Например, геном рекомбинантного вектора на основе AAV может содержать по меньшей мере одну последовательность ITR, фланкирующую промотор, "лишний" фрагмент, последовательность, представляющую интерес (например, средство для RNAi), и последовательность полиаденилирования. Полный геном вектора может содержать полную совокупность полинуклеотидных последовательностей вектора. В некоторых вариантах осуществления титр нуклеиновых кислот вирусного вектора можно измерять в единицах vg/мл. Способы, подходящие для измерения данного титра, известны из уровня техники (например, количественная ПНР).

Выражения "инфекционная единица (iu)", "инфекционная частица" или "единица репликации", применяемые в отношении вирусного титра, относятся к числу инфекционных и репликационно компетентных частиц вектора на основе рекомбинантного AAV, измеряемому с помощью анализа инфекционных центров, также известного как анализ центров репликации, описанного, например, в McLaughlin et al. (1988) *J. Virol.*, 62:1963-1973.

Выражение "трансдуцирующая единица (tu)", применяемое в отношении вирусного титра, относится к числу инфекционных частиц вектора на основе рекомбинантного AAV, которые приводят к получению функционального трансгенного продукта, измеряемому в функциональных анализах, таких как описанные в примерах в данном документе или, например, в Xiao et al. (1997) *Exp. Neurobiol.*, 144:113-124; или в Fisher et al. (1996) *J. Virol.*, 70:520-532 (анализ LFU).

"Инвертированный концевой повтор" или последовательность "ITR" является выражением, широко распространенным в данной области техники, и относится к относительно коротким последовательностям, встречающимся на концах геномов вирусов, которые имеют противоположную ориентацию.

Последовательность "инвертированного концевого повтора (ITR) AAV", выражение, широко распространенное в данной области техники, представляет собой последовательность примерно из 145 нуклеотидов, которая присутствует на обоих концах нативного одноцепочечного генома AAV. Крайние 125 нуклеотидов ITR могут присутствовать в любой из двух альтернативных ориентации, обуславливая гетерогенность между различными геномами AAV и между двумя концами одного генома AAV. Крайние 125 нуклеотидов также содержат несколько более коротких областей самокомплементарности (обозначенных как A-, A'-, B-, B'-, C-, C'- и D-области), обеспечивающих образование внутрицепочечных пар оснований в пределах данной части ITR.

"Последовательность концевого разрешения" или "trs" представляет собой последовательность в D-

области ITR AAV, которая отщепляется белками гер AAV в ходе репликации вирусной ДНК. Мутантная последовательность концевой разрешения является невосприимчивой к отщеплению белками гер AAV.

"Вирус-помощник" для AAV относится к вирусу, который способствует репликации и упаковке AAV (который является дефектным парвовирусом) в клетке-хозяине. Было идентифицировано множество таких вирусов-помощников, в том числе аденовирусы, герпес-вирусы и поксвирусы, такие как вирус осповакцины. Аденовирусы охватывают множество различных подгрупп, однако наиболее широко применяется аденовирус 5 типа подгруппы С (Ad5). Многочисленные аденовирусы, происходящие от человека, отличных от человека млекопитающих и птиц, известны и доступны из депозитариев, таких как ATCC. Вирусы семейства герпес-вирусов, которые также доступны из депозитариев, таких как ATCC, включают, например, вирусы простого герпеса (HSV), вирусы Эпштейна-Барр (EBV), цитомегаловирусы (CMV) и вирусы псевдобешенства (PRV).

"Процентная (%) идентичность последовательностей" в отношении эталонной полипептидной последовательности или последовательности нуклеиновой кислоты определена как процентная доля аминокислотных остатков или нуклеотидов в последовательности-кандидате, которые идентичны аминокислотным остаткам или нуклеотидам в эталонной полипептидной последовательности или последовательности нуклеиновой кислоты после выравнивания последовательностей и введения гэпов, при необходимости, для достижения максимальной процентной идентичности последовательностей и без учета каких-либо консервативных замен как части идентичности последовательностей. Выравнивание для целей определения процентной идентичности аминокислотных последовательностей или последовательностей нуклеиновых кислот может быть достигнуто различными способами, которые находятся в пределах компетенции специалиста в данной области, например, с помощью общедоступных компьютерных программ, например, описанных в *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel et al., eds., 1987), Supp. 30, section 7.7.18, Table 7.7.1, и в том числе программного обеспечения BLAST, BLAST-2, ALIGN или Megalign (DNASTAR). Примером программы для выравнивания является ALIGN Plus (Scientific and Educational Software, Пенсильвания). Специалисты в данной области могут определять соответствующие параметры для оценки выравнивания, в том числе любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по полной длине сравниваемых последовательностей. Для целей данного документа % идентичность аминокислотной последовательности к данной аминокислотной последовательности В, с ней или по отношению к ней для данной аминокислотной последовательности А (которую можно в качестве альтернативы назвать данной аминокислотной последовательностью А, которая характеризуется или обладает определенной % идентичностью аминокислотной последовательности к данной аминокислотной последовательности В, с ней или по отношению к ней) рассчитывается следующим образом: $100 \times \text{число совпадений} / \text{общее число остатков}$, где X/Y, где X представляет собой число аминокислотных остатков, учитываемых в качестве идентичных совпадений программой для выравнивания последовательностей в таком программном выравнивании А и В, и где Y представляет собой общее число аминокислотных остатков в В. Следует принимать во внимание, что если длина аминокислотной последовательности А не равна длине аминокислотной последовательности В, то % идентичности аминокислотной последовательности А к В не будет равна % идентичности аминокислотной последовательности В к А. Для целей данного документа % идентичность последовательности нуклеиновой кислоты к данной последовательности нуклеиновой кислоты D, с ней или по отношению к ней для данной последовательности нуклеиновой кислоты C (которую можно в качестве альтернативы назвать данной последовательностью нуклеиновой кислоты C, которая характеризуется или обладает определенной % идентичностью последовательности нуклеиновой кислоты к данной последовательности нуклеиновой кислоты D, с ней или по отношению к ней) рассчитывается следующим образом: $100 \times \text{число совпадений} / \text{общее число нуклеотидов}$, где W/Z, где W представляет собой число нуклеотидов, учитываемых в качестве идентичных совпадений программой для выравнивания последовательностей в таком программном выравнивании C и D, и где Z представляет собой общее число нуклеотидов в D. Следует принимать во внимание, что если длина последовательности нуклеиновой кислоты C не равна длине последовательности нуклеиновой кислоты D, то % последовательности нуклеиновой кислоты C к D не будет равна % идентичности последовательности нуклеиновой кислоты D к C.

"Выделенная" молекула (например, нуклеиновая кислота или белок) или клетка означает, что она была идентифицирована и отделена и/или извлечена из компонента своего естественного окружения.

"Эффективное количество" представляет собой количество, достаточное для достижения благоприятных или желаемых результатов, в том числе клинических результатов (например, уменьшения интенсивности симптомов, достижения клинических конечных точек и т.п.). Эффективное количество можно вводить за одно или несколько введений. Применительно к болезненному состоянию эффективным количеством является количество, достаточное для уменьшения интенсивности, стабилизации или задержки развития заболевания.

"Индивидуум" или "субъект" является млекопитающим. Млекопитающие включают, без ограничения, одомашненных животных (например, коров, овец, кошек, собак и лошадей), приматов (например, людей и отличных от человека приматов, таких как обезьяны), кроликов и грызунов (например, мышей и крыс). В некоторых вариантах осуществления индивидуум или субъект является человеком.

Как используется в данном документе, "лечение" представляет собой подход для получения благо-

приятных или желаемых клинических результатов. Для целей настоящего изобретения благоприятные или желаемые клинические результаты включают, без ограничения, облегчение симптомов, уменьшение степени тяжести заболевания, стабилизацию (например, отсутствие ухудшения) болезненного состояния, предупреждение распространения (например, метастазирования) заболевания, задержку или замедление прогрессирования заболевания, уменьшение интенсивности или временное ослабление проявлений болезненного состояния и ремиссию (как частичную, так и полную), как выявляемые, так и невыявляемые. "Лечение" может означать также продление выживаемости по сравнению с ожидаемой выживаемостью в случае неполучения лечения.

Используемое в данном документе выражение "профилактическое лечение" относится к лечению, при котором у индивидуума известно или подозревается наличие или имеется риск наличия нарушения, но не проявляются симптомы или проявляются минимальные симптомы нарушения. Индивидуума, подвергающегося профилактическому лечению, можно лечить до начала проявления симптомов.

Как используется в данном документе, "терапевтическое" средство (например, терапевтические полипептид, нуклеиновая кислота или трансген) представляет собой средство, обеспечивающее благоприятный или желаемый клинический результат, как, например, иллюстративные клинические результаты, описанные выше. Таким образом, терапевтическое средство можно применять в лечении, как описано выше.

Выражение "центральная зона сетчатки", используемое в данном документе, относится к наружной части желтого пятна, и/или к внутренней части желтого пятна, и/или к центральной ямке. Выражение "типы клеток центральной зоны сетчатки", используемое в данном документе, относится к типам клеток центральной зоны сетчатки, таким как, например, RPE и фоторецепторные клетки.

Выражение "желтое пятно" относится к области центральной зоны сетчатки у приматов, которая содержит фоторецепторные клетки, в частности, палочки и колбочки, в более высокой относительной концентрации по сравнению с периферической зоной сетчатки. Выражение "наружная часть желтого пятна", используемое в данном документе, также может упоминаться как "периферическая часть желтого пятна". Выражение "внутренняя часть желтого пятна", используемое в данном документе, также может упоминаться как "центральная часть желтого пятна".

Выражение "центральная ямка" относится к небольшой области в центральной зоне сетчатки приматов, диаметр которой примерно равен или составляет менее 0,5 мм, которая содержит фоторецепторные клетки, в частности, колбочки, в более высокой относительной концентрации по сравнению с периферической зоной сетчатки и желтым пятном.

Выражение "субретинальное пространство", используемое в данном документе, относится к местоположению в сетчатке между фоторецепторными клетками и клетками пигментного эпителия сетчатки. Субретинальное пространство может являться предполагаемым пространством, как, например, до какой-либо субретинальной инъекции жидкости. Субретинальное пространство может также содержать жидкость, введенную путем инъекции в предполагаемое пространство. В этом случае жидкость находится "в контакте с субретинальным пространством". Клетки, которые находятся "в контакте с субретинальным пространством", включают клетки, которые ограничивают субретинальное пространство, такие как RPE и фоторецепторные клетки.

Выражение "пузырек", используемое в данном документе, относится к жидкому пространству в пределах субретинального пространства глаза. Пузырек по настоящему изобретению можно создать посредством однократной инъекции жидкости в одно пространство, посредством нескольких инъекций одной или нескольких жидкостей в одно и то же пространство или посредством нескольких инъекций в несколько пространств, которые при перемещении создают общее жидкое пространство, применимое для достижения терапевтического эффекта на желаемой части субретинального пространства.

Выражение "промотор родопсинкиназы (RK)" относится к полинуклеотидной последовательности, полученной из гена родопсинкиназы (например, RK человека, представленного геном с ID 6011 в GenBank Entrez), которая специфически управляет экспрессией в палочковых и колбочковых фоторецепторных клетках, а также в линиях клеток сетчатки, таких как WERI Rb-1. Выражение "промотор родопсинкиназы", используемое в данном документе, может относиться к полной промоторной последовательности или к фрагменту промоторной последовательности, достаточному для управления специфичной для фоторецепторов экспрессией, таким как последовательности, описанные в Khani S.C. et al. (2007) Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 48(9):3954-61 и Young J.E. et al. (2003) Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 44(9):4076-85. В некоторых вариантах осуществления промотор RK располагается от -112 до +180 относительно сайта начала транскрипции.

"промотор β -актина курицы (CBA)" относится к полинуклеотидной последовательности, полученной из гена β -актина курицы (например, гена бета-актина Gallus gallus, представленного геном с ID 396526 в GenBank Entrez). Как используется в данном документе, "промотор β -актина курицы" может относиться к промотору, содержащему ранний энхансерный элемент цитомегаловируса (CMV), промотор и первый экзон и интрон гена β -актина курицы и акцепторный сайт сплайсинга гена бета-глобина кролика, такому как последовательности, описанные в Miyazaki, J., et al. (1989) Gene 79(2):269-77. Используемое в данном документе выражение "промотор CAG" может использоваться взаимозаменяемо.

Используемое в данном документе выражение "ранний энхансер CMV/промотор бета-актина курицы (CAG)" может использоваться взаимозаменяемо.

Ссылка на "приблизительное" значение или параметр в данном документе включает (и описывает) варианты осуществления, которые направлены на это значение или параметр как таковые. Например, описание, относящееся к "приблизительно X", включает описание "X".

Используемые в данном документе формы единственного числа включают ссылки на множественное число, если не указано иное.

Понятно, что аспекты и варианты осуществления настоящего изобретения, описанные в данном документе, включают "содержащие", "состоящие из" и/или "состоящие по сути из" аспекты и варианты осуществления.

III. Вирусные частицы.

Гепарансульфатсодержащий протеогликан (HSPG), как известно из уровня техники, выступает в качестве клеточного рецептора для частиц AAV2 (Summerford, C. and Samulski, R.J. (1998) *J. Virol.* 72(2):1438-45). Связывание между частицей AAV2 и HSPG на клеточной мембране служит для прикрепления частицы к клетке. Другие белки клеточной поверхности, такие как рецептор фактора роста фибробластов и интегрин $\alpha\beta 5$, также могут способствовать инфицированию клетки. После связывания частица AAV2 может поступать в клетку с помощью механизмов, включающих рецептор-опосредованный эндоцитоз посредством ямок, окаймленных клатрином. Частица AAV2 может высвобождаться из эндоцитозной везикулы при подкислении эндосом. Это позволяет частице AAV2 перемещаться в перинуклеарную зону и затем в клеточное ядро. О частицах AAV3 также известно, что они связываются с гепараном (Rabinowitz, J.E., et al. (2002) *J. Virol.* 76(2):791-801).

Протоколы генной терапии в отношении нарушений со стороны глаза требуют локализованной доставки вектора в клетки глаза (например, в клетки сетчатки). Клетки, которые будут мишенями для лечения при данных заболеваниях, могут включать, помимо прочего, одну или несколько клеток глаза (например, фоторецепторы, зрительные нейроны и т.д.). Способы и наборы по настоящему изобретению по меньшей мере частично основаны на обнаружении того, что определенные капсиды gAAV (например, содержащие капсидный белок gAAV, содержащий одну или несколько аминокислотных замен в одном или нескольких положениях, в которых происходит взаимодействие с гепарансульфатсодержащим протеогликаном) обеспечивают обширное распределение векторов среди клеток глаза. Таким образом, данные капсиды могут быть особенно преимущественными для доставки гетерологичной нуклеиновой кислоты в глаз индивидуума, улучшения трансдукции клеток, опосредованной gAAV, после доставки частицы gAAV в глаз индивидуума, улучшения экспрессии гетерологичной нуклеиновой кислоты после доставки частиц gAAV в глаз индивидуума и/или лечения нарушения со стороны глаза у индивидуума с применением частиц gAAV.

Подобно этому, протоколы генной терапии в отношении нарушений со стороны CNS требуют локализованной доставки вектора в клетки CNS. Клетки, которые будут мишенями для лечения при данных заболеваниях, могут включать, помимо прочего, одну или несколько клеток головного мозга (например, нейроны). Способы и наборы по настоящему изобретению по меньшей мере частично основаны на обнаружении того, что определенные капсиды gAAV (например, содержащие капсидный белок gAAV, содержащий одну или несколько аминокислотных замен в одном или нескольких положениях, в которых происходит взаимодействие с гепарансульфатсодержащим протеогликаном) обеспечивают обширное распределение векторов среди клеток CNS. Таким образом, данные капсиды могут быть особенно преимущественными для доставки гетерологичной нуклеиновой кислоты в центральную нервную систему (CNS) индивидуума, улучшения трансдукции клеток, опосредованной gAAV, после доставки частицы gAAV в CNS индивидуума, улучшения экспрессии гетерологичной нуклеиновой кислоты после доставки частиц gAAV в CNS индивидуума и/или лечения нарушения со стороны CNS у индивидуума с применением частиц gAAV.

Известно, что капсид AAV (например, AAV2, AAVrh8R и т.д.) содержит три капсидных белка: VP1, VP2 и VP3. Эти белки содержат значительные количества перекрывающихся аминокислотных последовательностей и уникальные N-концевые последовательности. Капсид AAV2 содержит 60 субъединиц, расположенных по принципу икосаэдрической симметрии (Xie, Q., et al. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99(16):10405-10). Было обнаружено, что VP1, VP2 и VP3 присутствуют в соотношении 1:1:10.

Известно, что связывание между капсидными белками AAV2 и HSPG происходит посредством электростатических взаимодействий между основными остатками капсидных белков AAV2 и отрицательно заряженными остатками гликозаминогликана (Opie, S.R. et al. (2003), *J. Virol.* 77:6995-7006; Kern, A et al. (2003) *J. Virol.* 77:11072-11081). Конкретные остатки капсида, вовлеченные в эти взаимодействия, включают R484, R487, K532, R585 и R588. Было показано, что мутации в этих остатках ослабляют связывание AAV2 с клетками HeLa и самим гепараном (Opie, S.R. et al. (2003), *J. Virol.* 77:6995-7006; Kern, A et al. (2003), *J. Virol.* 77:11072-11081; WO 2004/027019 A2, патент США № 7629322). Дополнительно, не желая ограничиваться какой-либо теорией, полагают, что посредством аминокислотной(аминокислотных) замены(замен) одного или нескольких остатков, соответствующих аминокислотам 484, 487, 532, 585 или 588, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAV2, можно моду-

лизовать трансдукционные свойства типов капсидов AAV, которые не связываются с HSPG, или можно модулировать трансдукционные свойства типов капсидов AAV независимо от их способности к связыванию с HSPG.

Определенные аспекты настоящего изобретения относятся к доставке гетерологичной нуклеиновой кислоты в глаз или центральную нервную систему (CNS) индивидуума, включающей введение частицы рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV) в глаз или CNS индивидуума. В некоторых вариантах осуществления частица rAAV содержит капсид rAAV, содержащий капсидные белки rAAV, содержащие одну или несколько аминокислотных замен в одном или нескольких положениях, в которых происходит взаимодействие с гепарансульфатсодержащим протеогликаном. В некоторых вариантах осуществления частица rAAV по настоящему изобретению содержит капсид AAV серотипа 2 (AAV2). В некоторых вариантах осуществления частица rAAV по настоящему изобретению содержит капсид AAV серотипа rh8R (AAVrh8R).

Как описано в данном документе, частицы rAAV с мутациями в остатках капсидных белков, которые взаимодействуют с HSPG, или в одном или нескольких остатках, соответствующих аминокислотам 484, 487, 532, 585 или 588, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAV2, демонстрируют преимущественные свойства, такие как усиленная экспрессия и/или сниженное нейровоспаление. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления после доставки гетерологичная нуклеиновая кислота, кодируемая вектором на основе rAAV, экспрессируется с повышенном уровне экспрессии по сравнению с уровнем экспрессии гетерологичной нуклеиновой кислоты частицы rAAV, содержащей капсид rAAV, содержащий эталонный капсидный белок rAAV (например, капсидный белок rAAV дикого типа). В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии нуклеиновой кислоты повышен по меньшей мере на приблизительно 10%, по меньшей мере на приблизительно 25%, по меньшей мере на приблизительно 50%, по меньшей мере на приблизительно 75% или по меньшей мере на приблизительно 100%. В некоторых вариантах осуществления после доставки частица rAAV вызывает сниженное нейровоспаление по сравнению с частицей rAAV, содержащей эталонный капсидный белок rAAV (например, капсидный белок rAAV дикого типа). В некоторых вариантах осуществления нейровоспаление снижено по меньшей мере на приблизительно 10%, по меньшей мере на приблизительно 25%, по меньшей мере на приблизительно 50%, по меньшей мере на приблизительно 75% или по меньшей мере на приблизительно 100%. Подходящий эталонный капсидный белок rAAV может включать в себя любой капсидный белок, у которого отсутствуют одна или несколько аминокислотных замен в одном или нескольких положениях, в которых происходит взаимодействие с гепарансульфатсодержащим протеогликаном (эталонный капсид может, таким образом, содержать одну или несколько "фоновых" замен, которые не изменяют связывание с HSPG).

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает способы доставки гетерологичной нуклеиновой кислоты в глаз индивидуума, включающие введение частицы рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV) в субретинальное пространство индивидуума, где частица rAAV содержит а) капсид rAAV, содержащий капсидные белки rAAV, содержащие одну или несколько аминокислотных замен в одном или нескольких положениях, в которых происходит взаимодействие с гепарансульфатсодержащим протеогликаном, и б) вектор на основе rAAV, содержащий гетерологичную нуклеиновую кислоту и по меньшей мере один инвертированный концевой повтор AAV.

В некоторых вариантах осуществления частица rAAV по настоящему изобретению содержит капсид AAV серотипа 2 (AAV2). В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен представляют собой замены аминокислотных остатков любого из VP1, VP2 и/или VP3 AAV2, где аминокислотные замены изменяют взаимодействие частицы rAAV с HSPG (например, ослабляют или устраняют связывание с HSPG). В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен представляют собой замены аминокислотных остатков VP1 AAV2. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен представляют собой замены аминокислотных остатков VP2 AAV2. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен представляют собой замены аминокислотных остатков VP3 AAV2. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен представляют собой замены аминокислотных остатков комбинации VP1, VP2 и VP3 AAV2. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен представляют собой замены аминокислотных остатков любого из VP1, VP2 и/или VP3 AAV2. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен представляют собой замены аминокислотных остатков любого из капсидных белков с SEQ ID NO: 1, 3 и/или 5. В некоторых вариантах осуществления частицы rAAV по настоящему изобретению содержат капсидные белки с SEQ ID NO: 2, 4 и/или 6.

В некоторых вариантах осуществления частица rAAV по настоящему изобретению содержит капсид AAV серотипа 3 (AAV3). В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен представляют собой замены аминокислотных остатков любого из VP1, VP2 и/или VP3 AAV3, где аминокислотные замены изменяют взаимодействие частицы rAAV с HSPG (например, ослабляют или устраняют связывание с HSPG). В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен представляют собой замены аминокислотных остатков VP1 AAV3. В некоторых вариантах

[illegible]

тельно 30% или от приблизительно 10% до приблизительно 20% (по сравнению со связыванием частицы гAAV, содержащей капсид дикого типа). В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен приводят к невыявляемому связыванию частицы гAAV с гепарансульфатсодержащим протеогликаном по сравнению со связыванием частицы гAAV дикого типа. Способы измерения связывания частиц AAV с HSPG; например, связывания с хроматографической средой на основе гепарансульфата или связывания с клеткой, о которой известно, что она экспрессирует HSPG на своей поверхности, известны из уровня техники. Например, см. Opie, SR et al. (2003) *J. Virol.* 77:6995-7006 и Kern, A et al. (2003) *J. Virol.* 77:11072-11081.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает частицы гAAV для субретинальной доставки терапевтической нуклеиновой кислоты, где частицы гAAV содержат одну или несколько аминокислотных замен в капсидных белках, которые ослабляют или устраняют связывание частицы гAAV с гепарансульфатсодержащим протеогликаном, где одна или несколько аминокислотных замен находятся в положениях 484, 487, 532, 585 или 588, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAV2. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен находятся в положениях 484, 487, 532, 585 или 588 VP1 AAV2. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен находятся в положениях 484, 487, 532, 585 или 588 VP2 AAV2, нумерация которых приведена согласно VP1 AAV2. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен находятся в положениях 484, 487, 532, 585 или 588 VP3 AAV2, нумерация которых приведена согласно VP1 AAV2. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен находятся в положениях 484, 487, 532, 585 или 588 VP1 AAV2, VP2 AAV2 и/или VP3 AAV2, нумерация которых приведена согласно VP1 AAV2. В некоторых вариантах осуществления VP1 гAAV2 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен находятся в положениях 484, 487, 532, 585 или 588 VP1 AAV3, нумерация которых приведена согласно VP1 AAV2. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен находятся в положениях 484, 487, 532, 585 или 588 VP2 AAV3, нумерация которых приведена согласно VP1 AAV2. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен находятся в положениях 484, 487, 532, 585 или 588 VP3 AAV3, нумерация которых приведена согласно VP1 AAV2. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен находятся в положениях 484, 487, 532, 585 или 588 VP1 AAV3, VP2 AAV3 и/или VP3 AAV3, нумерация которых приведена согласно VP1 гAAV2. В некоторых вариантах осуществления VP1 гAAV2 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления частицы AAV по настоящему изобретению содержат капсид с одной или несколькими аминокислотными заменами в положениях 485, 488, 528, 533, 586 или 589, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAVrh8R. В некоторых вариантах осуществления нумерация приведена по VP1 AAVrh8R, содержащему аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену положительно заряженного аминокислотного остатка аминокислотным остатком, который не является положительно заряженным. В некоторых вариантах осуществления положительно заряженный аминокислотный остаток заменен гидрофобным аминокислотным остатком. В дополнительных вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену аргининового или лизинового остатка. В еще нескольких дополнительных вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену аргининового или лизинового остатка аланиновым остатком. В других вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену аминокислотного остатка, который не является положительно заряженным, на положительно заряженный аминокислотный остаток. В некоторых вариантах осуществления гидрофобный аминокислотный остаток заменен положительно заряженным аминокислотным остатком. В дополнительных вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену аланинового остатка. В еще нескольких дополнительных вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену аргининового или лизинового остатка аланиновым остатком. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену в положениях R533 и/или A586, нумерация которых приведена согласно VP1 AAVrh8R. В дополнительных вариантах осуществления капсид AAV содержит аминокислотные замены A586R и/или R533A, нумерация для которых приведена согласно VP1 AAVrh8R. В некоторых вариантах осуществления частица гAAV содержит капсидные белки гAAV с SEQ ID NO: 10 и/или 11.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения одна или несколько аминокислотных замен включают замену положительно заряженного аминокислотного остатка (например, аминокислоты с положительно заряженной боковой цепью) аминокислотным остатком, который не является положительно заряженным (например, аминокислотой, которая не содержит положительно заряженную боковую цепь). Положительно заряженные аминокислоты включают аргинин, гистидин и лизин. Примеры аминокислотных остатков, которые не являются положительно заряженными, включают отрицательно заряженные аминокислоты (аспарагиновую кислоту и глутаминовую кислоту), аминокислоты с неза-

ряженными полярными боковыми цепями (серин, треонин, аспарагин и глутамин), аминокислоты с гидрофобными боковыми цепями (аланин, валин, изолейцин, лейцин, метионин, фенилаланин, тирозин и триптофан), глицин, цистеин и пролин. В некоторых вариантах осуществления один или несколько положительно заряженных аминокислотных остатков капсида AAV заменены гидрофобным аминокислотным остатком. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену аргининового или лизинового остатка. В дополнительных вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену аргининового или лизинового остатка аланиновым остатком. В других вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену аминокислотного остатка, который не является положительно заряженным, на положительно заряженный аминокислотный остаток. В некоторых вариантах осуществления гидрофобный аминокислотный остаток заменен положительно заряженным аминокислотным остатком. В дополнительных вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену аланинового остатка. В еще нескольких дополнительных вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену аргининового или лизинового остатка аланиновым остатком.

В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену в положениях R484, R487, K527, K532, R585 и/или R588 VP1, VP2 и/или VP3, нумерация которых приведена согласно VP1 AAV2. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену в положениях R484, R487, K527, K532, R585 и/или R588 VP1, VP2 и/или VP3 AAV2, нумерация которых приведена согласно VP1 AAV2. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену в положениях R484, R487, K527, K532 и/или R588 VP1, VP2 и/или VP3 AAV2, нумерация которых приведена согласно SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают одну или несколько замен R484A, R487A, R585A и/или R588A VP1, VP2 и/или VP3 AAV2, нумерация для которых приведена согласно VP1 AAV2. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену в положениях R484, R487, K527, K532, R585 и/или R588 VP1, VP2 и/или VP3 AAV3, нумерация которых приведена согласно VP1 AAV2. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают одну или несколько замен R484A, R487A, R585A и/или R588A VP1, VP2 и/или VP3 AAV3, нумерация для которых приведена согласно VP1 AAV2. В некоторых вариантах осуществления частица gAAV содержит капсидные белки gAAV с SEQ ID NO: 2, 4 и/или 6.

В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену в положениях R485, R488, R533, A586 и/или T589 VP1, VP2 и/или VP3, нумерация которых приведена согласно VP1 AAVrh8R. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену в положениях R485, R488, R533, A586 и/или T589 VP1, VP2 и/или VP3, нумерация которых приведена согласно VP1 AAVrh8R, нумерация для которых приведена согласно SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают одну или несколько замен R533A и/или A586R VP1, VP2 и/или VP3 AAV2, нумерация для которых приведена согласно VP1 AAVrh8R. В некоторых вариантах осуществления частица gAAV содержит капсидные белки gAAV с SEQ ID NO: 10 и/или 11.

В некоторых вариантах осуществления капсид AAV содержит одну или несколько аминокислотных замен в одном или нескольких положениях, в которых происходит взаимодействие с HSPG. В некоторых вариантах осуществления капсид AAV содержит одну или несколько аминокислотных замен в одном или нескольких положениях, которые ослабляют или устраняют связывание с HSPG. В некоторых вариантах осуществления капсид AAV содержит одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять аминокислотных замен, которые ослабляют или устраняют связывание с HSPG. В некоторых вариантах осуществления капсид AAV имеет одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять аминокислотных замен, которые ослабляют или устраняют связывание с HSPG. В некоторых вариантах осуществления капсид AAV содержит замены в положениях R484 и R487, нумерация которых приведена согласно VP1 gAAV2. В некоторых вариантах осуществления капсид AAV имеет замены в положениях R484 и R487, нумерация которых приведена согласно VP1 gAAV2. В некоторых вариантах осуществления капсид AAV содержит замены в положениях R585 и R588, нумерация которых приведена согласно VP1 gAAV2. В некоторых вариантах осуществления капсид AAV имеет замены в положениях R585 и R588, нумерация которых приведена согласно VP1 gAAV2. В некоторых вариантах осуществления капсид AAV содержит замены R484A и R487A, нумерация для которых приведена согласно VP1 gAAV2. В некоторых вариантах осуществления капсид AAV имеет замены R484A и R487A, нумерация для которых приведена согласно VP1 gAAV2. В некоторых вариантах осуществления капсид AAV содержит замены R585A и R588A, нумерация для которых приведена согласно VP1 gAAV2. В некоторых вариантах осуществления капсид AAV имеет замены R585A и R588A, нумерация для которых приведена согласно VP1 gAAV2.

Известно, что гепарансульфатсодержащие протеоглики (HSPG) экспрессируются во многих тканях во всем организме и играют важные роли во внеклеточном матриксе, адгезии клеток и клеточной сигнализации. В некоторых вариантах осуществления гепарансульфатсодержащий протеогликан экспрессируется на одной или нескольких клетках CNS. В определенных вариантах осуществления одна или

несколько клеток CNS представляют собой нейрон.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает частицы гAAV для доставки терапевтической нуклеиновой кислоты в CNS, где частицы гAAV содержат одну или несколько аминокислотных замен в капсидных белках, которые ослабляют или устраняют связывание частицы гAAV с гепарансульфатсодержащим протеогликаном. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен находятся в положениях 347, 350, 390, 395, 448, 451, 484, 487, 527, 532, 585 и/или 588, нумерация которых приведена согласно VP1 AAV2. Как используется в данном документе, "нумерация приведена согласно VP1 AAV2" относится к аминокислоте упомянутого капсидного белка, соответствующей упомянутой аминокислоте VP1 AAV2. Например, если одна или несколько аминокислотных замен находятся в положениях 347, 350, 390, 395, 448, 451, 484, 487, 527, 532, 585 и/или 588, нумерация которых приведена согласно VP1 AAV2, то одна или несколько аминокислотных замен произведены в отношении аминокислоты(аминокислот) упомянутого капсидного белка, соответствующих аминокислотам 347, 350, 390, 395, 448, 451, 484, 487, 527, 532, 585 и/или 588 VP1 AAV2. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен находятся в положениях R347, R350, K390, K395, R448, R451, R484, R487, K527, K532, R585 и/или R588, нумерация которых приведена согласно VP1 AAV2. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен находятся в положениях 484, 487, 532, 585 или 588 AAV2. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен находятся в положениях 484, 487, 532, 585 или 588 VP1 AAV2, VP2 AAV2 и/или VP3 AAV2, нумерация которых приведена согласно VP1 AAV2. В некоторых вариантах осуществления VP1 AAV2 (например, гAAV2) содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления капсид AAV содержит замены в положениях R484, R487, K527, K532, R585 и/или R588, нумерация которых приведена согласно VP1 гAAV2. В некоторых вариантах осуществления частицы гAAV по настоящему изобретению содержат капсидные белки с SEQ ID NO: 2, 4 и/или 6. В некоторых вариантах осуществления капсид AAV содержит замены в положениях R484 и R487 или R585 и R588, нумерация которых приведена согласно VP1 гAAV2. В некоторых вариантах осуществления капсид AAV содержит замены R484A и R487A или замены R585A и R588A, нумерация для которых приведена согласно VP1 AAV2. В некоторых вариантах осуществления капсид AAV содержит аминокислотные замены R585A и R588A, нумерация для которых приведена согласно VP1 AAV2. В некоторых вариантах осуществления капсид AAV содержит аминокислотную замену K532A, нумерация для которой приведена согласно VP1 AAV2. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замены R347A, R350A, K390A, K395A, R448A, R451A, R484A, R487A, K527A, K532A, R585A и/или R588A, нумерация для которых приведена согласно VP1 AAV2.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает частицы гAAV для доставки терапевтической нуклеиновой кислоты в CNS, где частицы гAAV содержат одну или несколько аминокислотных замен в капсидных белках, которые ослабляют или устраняют связывание частицы гAAV с гепарансульфатсодержащим протеогликаном. В некоторых вариантах осуществления частица гAAV по настоящему изобретению содержит капсид AAV серотипа rh8R (AAVrh8R), например, как описано в публикации заявки № 20090317417 до выдачи патента США. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен представляют собой замены аминокислотных остатков любого из VP1, VP2 и/или VP3 AAVrh8R, где аминокислотные замены изменяют взаимодействие частицы гAAV с HSPG (например, ослабляют или устраняют связывание с HSPG). В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен представляют собой замены аминокислотных остатков VP1 AAVrh8R. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен представляют собой замены аминокислотных остатков VP2 AAVrh8R. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен представляют собой замены аминокислотных остатков VP3 AAVrh8R. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен представляют собой замены аминокислотных остатков комбинации VP1, VP2 и VP3 AAVrh8R. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен представляют собой замены аминокислотных остатков любого из VP1, VP2 и/или VP3 AAVrh8R. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен представляют собой замены аминокислотных остатков капсидного белка, проиллюстрированного на примере SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления частицы гAAV по настоящему изобретению содержат капсидные белки с SEQ ID NO: 10 и/или 11.

В некоторых вариантах осуществления частица гAAV содержит капсид AAV серотипа rh8R (AAVrh8R). В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен находятся в положениях 586 и/или 589, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAVrh8R. В некоторых вариантах осуществления нумерация приведена по VP1 AAVrh8R, содержащему аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену в положениях A586 и/или T589, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAVrh8R. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену A586R, нумерация для которой приведена согласно VP1

AAVrh8R. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замены T589R или T589K, нумерация для которых приведена согласно VP1 AAVrh8R.

Как обсуждается выше, не желая ограничиваться какой-либо теорией, полагают, что посредством аминокислотной(аминокислотных) замены(замен) одного или нескольких остатков, соответствующих аминокислотам 484, 487, 532, 585 или 588, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAV2, можно модулировать трансдукционные свойства типов капсидов AAV, которые не связываются с HSPG, или можно модулировать трансдукционные свойства типов капсидов AAV независимо от их способности к связыванию с HSPG. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен охватывают одну или несколько аминокислот, соответствующих аминокислотам, показанным на фиг. 20. Например, в некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислот в положении(положениях), соответствующих аминокислотам 585 и/или 588 (нумерация которых приведена согласно VP1 AAV2), замещены аргининовыми остатками (например, S586 и/или T589 для AAV1 или AAV6; S586 и/или A589 для AAV9; A586 и/или T589 для AAVrh8R; Q588 и/или T591 для AAV8 и Q588 и/или A591 для AAVrh10). Эти модифицированные капсиды могут находить применение, помимо прочего, в улучшении интравитреальной трансдукции, нацеленной на сетчатку. В других вариантах осуществления одна или несколько аминокислот (например, аргинин или лизин) в положении(положениях), соответствующих аминокислотам 484, 487, 527 и/или 532 (нумерация которых приведена согласно VP1 AAV2), замещены аминокислотами, не являющимися положительно заряженными, такими как аланин (например, R485, R488, K528 и/или K533 для AAV1 или AAV6; R485, R488, K528 и/или R533 для AAV9 или AAVrh8R и R487, R490, K530 и/или R535 для AAV8 или AAVrh10). Эти модифицированные капсиды могут находить применение, помимо прочего, в улучшении субретинальной или происходящей в CNS трансдукции.

В некоторых вариантах осуществления частица gAAV содержит капсид AAV серотипа 1 (AAV1). В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен находятся в положениях 586 и/или 589, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAV1. В некоторых вариантах осуществления VP1 AAV1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену в положениях S586 и/или T589, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAV1. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замены S586R или S586K, нумерация для которых приведена согласно VP1 AAV1. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену T589R, нумерация для которой приведена согласно VP1 AAV1. В некоторых вариантах осуществления частица gAAV содержит капсид AAV серотипа 6 (AAV6). В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен находятся в положениях 586 и/или 589, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAV6. В некоторых вариантах осуществления нумерация приведена по VP1 AAV6, содержащему аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену в положениях S586 и/или T589, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAV6. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замены S586R или S586K, нумерация для которых приведена согласно VP1 AAV6. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену T589R, нумерация для которой приведена согласно VP1 AAV6. В некоторых вариантах осуществления частица gAAV содержит капсид AAV серотипа 8 (AAV8). В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен находятся в положениях 588 и/или 591, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAV8. В некоторых вариантах осуществления нумерация приведена по VP1 AAV8, содержащему аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену в положениях Q588 и/или T591, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAV8. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замены Q588R или Q588K, нумерация для которых приведена согласно VP1 AAV8. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену T591R, нумерация для которой приведена согласно VP1 AAV8. В некоторых вариантах осуществления частица gAAV содержит капсид AAV серотипа 9 (AAV9). В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен находятся в положениях 586 и/или 589, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAV9. В некоторых вариантах осуществления нумерация приведена по VP1 AAV9, содержащему аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 15. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену в положениях S586 и/или A589, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAV9. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замены S586R или S586K, нумерация для которых приведена согласно VP1 AAV9. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замены A589R или A589K, нумерация для которых приведена согласно VP1 AAV9. В некоторых вариантах осуществления частица gAAV содержит капсид AAV серотипа rh10 (AAVrh10). В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен находятся в положениях 588 и/или 591, нумерация которых приведена

согласно нумерации VP1 AAVrh10. В некоторых вариантах осуществления нумерация приведена по VP1 AAVrh10, содержащему аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 16. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену в положениях Q588 и/или A591, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAVrh10. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замены Q588R или Q588K, нумерация для которых приведена согласно VP1 AAVrh10. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен включают замену A591R, нумерация для которой приведена согласно VP1 AAVrh10.

IV. Способы лечения.

Протоколы генной терапии в отношении заболеваний сетчатки, таких как LCA, пигментная дистрофия сетчатки и возрастная макулярная дегенерация, требуют локализованной доставки вектора в клетки сетчатки. Клетки, которые будут мишенями для лечения при данных заболеваниях, представляют собой фоторецепторные клетки сетчатки или клетки RPE, лежащие под нейросенсорной частью сетчатки. Доставка векторов для генной терапии в эти клетки требует инъекции в субретинальное пространство между сетчаткой и RPE. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает способы доставки векторов на основе gAAV для генной терапии в клетки сетчатки, где векторы на основе gAAV инкапсидированы в капсид AAV, содержащий замены одного или нескольких аминокислотных остатков, которые взаимодействуют с HSPG.

В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает способы лечения нарушения со стороны CNS у индивидуума, включающие доставку композиции, содержащей частицы gAAV, в CNS индивидуума, где частицы gAAV содержат (a) капсид gAAV, содержащий капсидный белок gAAV, содержащий одну или несколько аминокислотных замен в одном или нескольких положениях, в которых происходит взаимодействие с гепарансульфатсодержащим протеогликаном, и (b) вектор на основе gAAV, содержащий гетерологичную нуклеиновую кислоту и по меньшей мере один концевой повтор AAV. Дополнительно, способы доставки гетерологичной нуклеиновой кислоты в центральную нервную систему (CNS) индивидуума, способы улучшения трансдукции клеток, опосредованной gAAV, после доставки частицы gAAV в CNS индивидуума и способы улучшения экспрессии гетерологичной нуклеиновой кислоты после доставки частицы gAAV в CNS индивидуума, описанные в данном документе, можно применять для доставки, например, гетерологичной нуклеиновой кислоты, такой как нуклеиновая кислота, кодирующая терапевтический полипептид или терапевтическую нуклеиновую кислоту. Эти способы могут находить применение, помимо прочего, в лечении нарушения со стороны CNS. В некоторых вариантах осуществления индивидуум является человеком.

Терапевтические векторы.

Настоящее изобретение предусматривает способы генной терапии глазных нарушений, где частицы gAAV, содержащие терапевтические векторы, доставляют в сетчатку индивидуума. Улучшенной трансдукции клеток сетчатки можно достичь путем инкапсидирования векторов на основе gAAV в капсиды gAAV (например, частицы gAAV2, gAAVrh8R и т.д.), где одна или несколько аминокислот капсида, которые взаимодействуют с HSPG, заменены таким образом, что связывание частиц gAAV с HSPG ослаблено или устранено. Вектор может содержать гетерологичную нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид (например, терапевтический или диагностический полипептид) и/или терапевтическую нуклеиновую кислоту. Нуклеиновую кислоту, которая кодирует терапевтические или диагностические полипептиды и/или терапевтическую нуклеиновую кислоту, можно получить с помощью способов, известных из уровня техники, с применением стандартных способов синтеза и рекомбинантных способов. В некоторых вариантах осуществления гетерологичная нуклеиновая кислота кодирует терапевтический полипептид. В некоторых вариантах осуществления гетерологичная нуклеиновая кислота кодирует диагностический полипептид. Неограничивающие примеры нуклеиновой кислоты, кодирующей терапевтические полипептиды, включают: нуклеиновые кислоты для замещения недостающего или мутантного гена, известного как обуславливающего заболевание сетчатки, например, Prph2, RPE65, MERTK, RPGR, RP2, RPGRIP, CNGA3, CNGB3 и GNAT2. Другие неограничивающие примеры нуклеиновых кислот, кодирующих терапевтические полипептиды, включают нуклеиновые кислоты, кодирующие нейротрофические факторы (такие как GDNF, CNTF, FGF2, PEDF, EPO), антиапоптозные гены (такие как BCL2, BCL-X, NFkB), ангиогенные факторы (такие как эндостатин, ангиостатин, sFlt) и противовоспалительные факторы (такие как IL10, IL1-RA, TGFβ, IL4). Другие терапевтические полипептиды против глазных нарушений включают, без ограничения, Myo7a, ABCA4, REP1, GUCY2D, PDE6C, RSI, RPGRIP, Lpcat1, AIPL1, RDH12, CHM. В некоторых вариантах осуществления кодируемый полипептид представляет собой человеческий вариант полипептида.

Нуклеиновые кислоты по настоящему изобретению могут кодировать полипептиды, которые представляют собой внутриклеточные белки, заякоренные в клеточной мембране, остающиеся внутри клетки или секретлируемые клеткой, трансдуцированные векторами по настоящему изобретению. В случае полипептидов, секретлируемых клеткой, которая получает вектор, полипептид может быть растворимым (т.е. не прикрепленным к клетке). Например, растворимые полипептиды лишены трансмембранной области и секретрируются из клетки. Методики идентификации и удаления последовательностей нуклеиновых ки-

слот, кодирующих трансмембранные домены, известны из уровня техники.

Векторы, которые можно вводить согласно настоящему изобретению, также включают векторы, содержащие нуклеиновую кислоту, которая кодирует РНК (например, средство для RNAi, рибозимы, miRNA, siRNA, антисмысловую РНК), которая при транскрипции с нуклеиновых кислот вектора может обеспечивать лечение глазного нарушения путем препятствования трансляции или транскрипции аномального или избыточного белка, ассоциированного с болезненным состоянием по настоящему изобретению. Например, нуклеиновые кислоты по настоящему изобретению могут кодировать РНК, которая обеспечивает лечение заболевания путем высокоспецифичного устранения или снижения уровня мРНК, кодирующей аномальные и/или избыточные белки. Последовательности терапевтических РНК включают средства для RNAi, малые ингибирующие РНК (siRNA), микроРНК (miRNA) и/или рибозимы (такие как рибозимы типа "головки молотка" и рибозимы, содержащие шпильки), которые могут обеспечивать лечение заболеваний путем высокоспецифичного устранения или снижения уровня мРНК, кодирующей аномальные и/или избыточные белки, такие как белки, встречающиеся при различных формах наследственной дегенерации сетчатки. Неограничивающие примеры глазных нарушений, которые можно лечить с помощью последовательностей терапевтических РНК, включают, например, аутосомно-доминантную пигментную дистрофию сетчатки (ADRP) и диабетическую ретинопатию. Примеры последовательностей терапевтических РНК и нуклеиновых кислот, кодирующих эти последовательности, которые можно применять в настоящем изобретении, включают описанные, например, в патенте США № 6225291, раскрытие которого включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. В некоторых вариантах осуществления последовательность терапевтической РНК представляет собой miR-708. В некоторых вариантах осуществления miR-708 применяют в комбинации с нуклеиновой кислотой, кодирующей родопсин дикого типа, в качестве части того же вектора на основе gAAV или в качестве части второго вектора на основе gAAV. В некоторых вариантах осуществления у нуклеиновой кислоты, кодирующей родопсин дикого типа, отсутствует последовательность-мишень для miR-708, расположенная в 3'-нетранслируемой области гена родопсина. Векторы на основе gAAV, кодирующие miR-708 и/или родопсин, представлены в предварительной заявке на патент США с регистрационным № 61/969027, включенной в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Определенные аспекты настоящего изобретения относятся к применению частиц gAAV (например, терапевтического вектора), которые содержат (а) капсид gAAV, содержащий капсидный белок gAAV, содержащий одну или несколько аминокислотных замен в одном или нескольких положениях, в которых происходит взаимодействие с гепарансульфатсодержащим протеогликаном, и (b) вектор на основе gAAV, содержащий гетерологичную нуклеиновую кислоту и по меньшей мере один концевой повтор AAV. В некоторых вариантах осуществления гетерологичная нуклеиновая кислота кодирует терапевтический полипептид или терапевтическую нуклеиновую кислоту. Как используется в данном документе, терапевтическая нуклеиновая кислота может представлять любую терапевтическую нуклеиновую кислоту по настоящему раскрытию или любую нуклеиновую кислоту, которая кодирует терапевтический полипептид по настоящему раскрытию. Терапевтическую нуклеиновую кислоту можно применять, например, для уменьшения интенсивности симптома, предупреждения или задержки прогрессирования и/или проведения лечения нарушения (например, нарушения, описанного в данном документе).

Улучшенной трансдукции клеток CNS можно достичь путем инкапсидирования векторов на основе gAAV в капсиды gAAV (например, gAAV2, gAAVrh8R и т.д.), где одна или несколько аминокислот капсида, которые взаимодействуют с HSPG, заменены таким образом, что связывание частиц gAAV с HSPG ослаблено или устранено. Вектор может содержать гетерологичную нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид (например, терапевтический или диагностический полипептид) и/или терапевтическую нуклеиновую кислоту. Нуклеиновую кислоту, которая кодирует терапевтические или диагностические полипептиды и/или терапевтическую нуклеиновую кислоту, можно получить с помощью способов, известных из уровня техники, с применением стандартных способов синтеза и рекомбинантных способов. В некоторых вариантах осуществления гетерологичная нуклеиновая кислота кодирует терапевтический полипептид. В некоторых вариантах осуществления гетерологичная нуклеиновая кислота кодирует диагностический полипептид. В некоторых вариантах осуществления гетерологичная нуклеиновая кислота кодирует ген, ассоциированный с CNS.

В некоторых вариантах осуществления гетерологичная нуклеиновая кислота кодирует терапевтическую нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления терапевтическая нуклеиновая кислота может включать, без ограничения, siRNA, shRNA, средство для RNAi, miRNA, антисмысловую РНК, рибозим или ДНК-фермент. Таким образом, терапевтическая нуклеиновая кислота может кодировать РНК, которая при транскрипции с нуклеиновых кислот вектора может обеспечивать лечение нарушения по настоящему изобретению (например, нарушения со стороны CNS) путем препятствования трансляции или транскрипции аномального или избыточного белка, ассоциированного с нарушением по настоящему изобретению. Например, нуклеиновые кислоты по настоящему изобретению могут кодировать РНК, которая обеспечивает лечение нарушения путем высокоспецифичного устранения или снижения уровня мРНК, кодирующей аномальные и/или избыточные белки. Последовательности терапевтических РНК включают средства для RNAi, малые ингибирующие РНК (siRNA), микроРНК (miRNA) и/или рибозимы

(такие как рибозимы типа "головки молотка" и рибозимы, содержащие шпильки), которые могут обеспечивать лечение нарушений путем высокоспецифичного устранения или снижения уровня мРНК, кодирующей аномальные и/или избыточные белки.

В некоторых вариантах осуществления гетерологичная нуклеиновая кислота кодирует терапевтический полипептид. Терапевтический полипептид может например, обеспечивать активность полипептида и/или фермента, которая отсутствует или присутствует на пониженном уровне в клетке или организме. В качестве альтернативы, терапевтический полипептид может обеспечивать активность полипептида и/или фермента, которая косвенно противодействует дисбалансу в клетке или организме. Например, терапевтический полипептид против нарушения, связанного с накоплением метаболита, вызванным дефицитом метаболических фермента или активности, может обеспечивать недостающие метаболические фермент или активность, или он может обеспечивать дополнительные метаболические фермент или активность, приводящие к снижению уровня метаболита. Терапевтический полипептид также можно применять для снижения активности полипептида (например, сверхэкспрессируемого, активируемого мутацией приобретения функции или того, регуляция активности которого нарушена иным образом) посредством действия, например, в качестве полипептида с доминантно-негативным эффектом.

В некоторых вариантах осуществления гетерологичная нуклеиновая кислота кодирует полипептид, выбранный из фермента, нейротрофического фактора, полипептида, дефицит или мутация которого наблюдаются у индивидуума с нарушением, связанным с CNS, антиоксиданта, антиапоптозного фактора, антиангиогенного фактора и противовоспалительного фактора. Такие полипептиды можно применять для лечения нарушений со стороны CNS посредством, например, обеспечения активности полипептида и/или фермента, которая снижена, отсутствует или характеризуется нарушенной регуляцией при нарушении со стороны CNS, уменьшения интенсивности выраженности причины и/или симптома нарушения со стороны CNS и/или уменьшения степени поражения CNS, вызванного нарушением со стороны CNS (например, апоптоза, воспаления или другого типа гибели клеток). Неограничивающие примеры нуклеиновой кислоты, кодирующей терапевтические полипептиды, включают нуклеиновые кислоты для замещения недостающего или мутантного гена, известного как обуславливающего нарушение со стороны CNS, например, Prph2, RPE65, MERTK, RPGR, RP2, RPGRIP, CNGA3, CNGB3 и GNAT2. Другие неограничивающие примеры нуклеиновых кислот, кодирующих терапевтические полипептиды, включают нуклеиновые кислоты, кодирующие нейротрофические факторы (такие как GDNF, CNTF, FGF2, PEDF, EPO), антиапоптозные гены (такие как BCL2, BCL-X, NFκB), антиангиогенные факторы (такие как эндостатин, ангиостатин, sFlt) и противовоспалительные факторы (такие как IL10, IL1-RA, TGFβ, IL4). Другие терапевтические полипептиды против нарушений со стороны CNS включают, без ограничения, Myo7a, ABCA4, REP1, GUCY2D, PDE6C, RS1, RPGRIP, Lpcat1, AIPL1, RDH12, CHM. В некоторых вариантах осуществления кодируемый полипептид представляет собой человеческий вариант полипептида. В некоторых вариантах осуществления гетерологичная нуклеиновая кислота кодирует белок, ингибирующий апоптоз нейронов (NAIP), фактор роста нервов (NGF), глиальный фактор роста (GDNF), мозговой фактор роста (BDNF), цилиарный нейротрофический фактор (CNTF), тирозингидроксилазу (TH), GTP-циклогидролазу (GTPCH), декарбоксилазу аминокислот (AADC), антиоксидант, антиангиогенный полипептид, противовоспалительный полипептид и/или аспартоацилазу (ASPA). Примеры антиоксидантов включают, без ограничения, SOD1; SOD2; каталазу; сиртуины 1, 3, 4 или 5; NRF2; PGC1a; GCL (каталитическую субъединицу); GCL (модифицирующую субъединицу); адипонектин; глутатионпероксидазу 1 и нейроглобин. Примеры антиангиогенных полипептидов включают, без ограничения, ангиостатин, эндостатин, PEDF, растворимый рецептор VEGF и растворимый рецептор PDGF. Примеры противовоспалительных полипептидов включают, без ограничения, IL-10, растворимый IL17R, растворимый TNF-R, TNF-R-Ig, ингибитор IL-1 и ингибитор IL18. Другие иллюстративные полипептиды из этих классов, которые можно применять для лечения нарушения со стороны CNS, приведены ниже.

Нуклеиновые кислоты по настоящему изобретению могут кодировать полипептиды, которые представляют собой внутриклеточные белки, заякоренные в клеточной мембране, остающиеся внутри клетки или секретируемые клеткой, трансдуцированной векторами по настоящему изобретению. В случае полипептидов, секретируемых клеткой, которая получает вектор, полипептид может быть растворимым (т.е. не прикрепленным к клетке). Например, растворимые полипептиды лишены трансмембранной области и секретируются из клетки. Методики идентификации и удаления последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих трансмембранные домены, известны из уровня техники.

В некоторых вариантах осуществления гетерологичная нуклеиновая кислота функционально связана с промотором. Иллюстративные промоторы включают, без ограничения, немедленно-ранний промотор цитомегаловируса (CMV), LTR RSV, LTR MoMLV, промотор фосфолипидкиназы-1 (PGK), промотор вируса обезьян 40 (SV40) и промотор СК6, промотор транскриптора (TTR), промотор ТК, тетрациклин-чувствительный промотор (TRE), промотор HBV, промотор hAAT, LSP-промотор, химерные печень-специфичные промоторы (LSP), промотор E2F, промотор теломеразы (hTERT); промотор энхансер цитомегаловируса/промотор бета-актина курицы/промотор β-глобина кролика (промотор CAG; Niwa et al., Gene, 1991, 108(2): 193-9) и промотор фактора элонгации 1-альфа (EF1-альфа) (Kim et al., Gene, 1990, 91(2):217-23 и Guo et al., Gene Ther., 1996, 3(9):802-10). В некоторых вариантах осуществления

промотор включает в себя промотор β -глюкуронидазы человека или энхансер цитомегаловируса, соединенный с промотором β -актина курицы (CBA). Промотор может представлять собой конститутивный, индуцируемый или репрессируемый промотор. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает рекомбинантный вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую гетерологичный трансген по настоящему раскрытию, функционально связанный с промотором CBA. Иллюстративные промоторы и их описания могут быть найдены, например, в публикации заявки № 20140335054 до выдачи патента США.

Примеры конститутивных промоторов включают, без ограничения, ретровирусный промотор LTR вируса саркомы Рауса (RSV) (необязательно с энхансером RSV), промотор цитомегаловируса (CMV) (необязательно с энхансером CMV) [см., например, Boshart et al., *Cell*, 41:521-530 (1985)], промотор SV40, промотор дигидрофолатредуктазы, промотор 13-актина, промотор фосфолипидкиназы (PGK) и промотор EF1a [Invitrogen].

Индукцируемые промоторы обеспечивают регуляцию экспрессии генов и могут регулироваться экзогенно предоставляемыми соединениями, факторами окружающей среды, такими как температура, или наличием конкретного физиологического состояния, например, в острой фазе, в определенном состоянии дифференцировки клетки или только в размножающихся клетках. Индуцируемые промоторы и индуцируемые системы доступны из ряда коммерческих источников, включающих, без ограничения, Invitrogen, Clontech и Ariad. Многие другие системы были описаны и могут быть без труда выбраны специалистом в данной области. Примеры индуцируемых промоторов, регулируемых экзогенно предоставляемыми соединениями, включают индуцируемый цинком промотор металлотионеина овцы (MT), индуцируемый дексаметазоном (Dex) промотор вируса опухоли молочной железы мышей (MMTV), промоторную систему полимеразы T7 (WO 98/10088); индуцируемый экдизоном насекомых промотор (No et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:3346-3351 (1996)), репрессируемую тетрациклином систему (Gossen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:5547-5551 (1992)), индуцируемую тетрациклином систему (Gossen et al., *Science*, 268:1766-1769 (1995), см. также Harvey et al., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2:512-518 (1998)), индуцируемую RU486 систему (Wang et al., *Nat. Biotech.*, 15:239-243 (1997), и Wang et al., *Gene Ther.*, 4:432-441 (1997)) и индуцируемую рапамицином систему (Magari et al., *J. Clin. Invest.*, 100:2865-2872 (1997)). Еще несколько других типов индуцируемых промоторов, которые могут быть применимыми в данном контексте, представляют собой промоторы, регулируемые конкретным физиологическим состоянием, например, температурой, острой фазой, определенным состоянием дифференцировки клетки или только в размножающихся клетках.

В другом варианте осуществления для трансгена применяется нативный промотор или его фрагмент. Нативный промотор можно применять в тех случаях, когда желательно, чтобы экспрессия трансгена имитировала экспрессию нативного гена. Нативный промотор можно применять в тех случаях, когда экспрессия трансгена должна регулироваться во времени, или в зависимости от стадии развития, или тканеспецифичным образом, или в ответ на конкретные транскрипционные стимулы. В дополнительном варианте осуществления для имитации экспрессии нативного гена также можно применять другие нативные элементы, осуществляющие контроль экспрессии, такие как энхансерные элементы, сайты полиаденилирования или консенсусные последовательности Козака.

В некоторых вариантах осуществления регуляторные последовательности придают способности к тканеспецифичной экспрессии генов. В некоторых случаях тканеспецифичные регуляторные последовательности связываются с тканеспецифичными факторами транскрипции, которые индуцируют транскрипцию тканеспецифичным образом. Такие тканеспецифичные регуляторные последовательности (например, промоторы, энхансеры и т.д.) хорошо известны из уровня техники. Иллюстративные тканеспецифичные регуляторные последовательности включают, без ограничения, следующие тканеспецифичные промоторы: нейрональные, такие как промотор нейрон-специфической енолазы (NSE) (Andersen et al., *Cell. Mol. Neurobiol.*, 13:503-15 (1993)), промотор легкой цепи нейрофиламента (Piccoli et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:5611-5 (1991)) и промотор нейрон-специфического гена *vfg* (Piccoli et al., *Neuron*, 15:373-84 (1995)). В некоторых вариантах осуществления тканеспецифичный промотор представляет собой промотор, выбранный из гена нейронального ядерного белка (NeuN), гена глиофибрилярного кислого белка (GFAP), гена, обуславливающего аденоматозный полипоз толстой кишки (APC), и гена адаптерной молекулы 1, связывающей ионизированный кальций (Iba-1). Другие подходящие тканеспецифичные промоторы будут очевидны специалисту в данной области. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой промотор бета-актина курицы.

В некоторых вариантах осуществления гетерологичная нуклеиновая кислота находится под контролем промоторной последовательности, обеспечивающей экспрессию в одной или нескольких клетках CNS. Для многих промоторных последовательностей, перечисленных выше (например, промотора CBA), из уровня техники известна экспрессия в одной или нескольких клетках CNS. В некоторых вариантах осуществления промоторная последовательность может повсеместно экспрессироваться в организме и, таким образом, может экспрессироваться в одной или нескольких клетках CNS благодаря ее доставке в CNS. В других вариантах осуществления можно применять промоторную последовательность, которая специфически экспрессируется в CNS или в подсовокупности из одной или нескольких клеток CNS. В

некоторых вариантах осуществления гетерологичная нуклеиновая кислота функционально связана с промотором, подходящим для экспрессии терапевтического полипептида или терапевтической нуклеиновой кислоты в одной или нескольких клетках CNS. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления терапевтический полипептид или терапевтическую нуклеиновую кислоту по настоящему изобретению можно применять для лечения нарушения со стороны CNS.

В некоторых вариантах осуществления промотор обеспечивает экспрессию гетерологичной нуклеиновой кислоты в клетке головного мозга. Клетка головного мозга может относиться к любой клетке головного мозга, известной из уровня техники, в том числе, без ограничения, к нейрону (такому как чувствительный нейрон, двигательный нейрон, вставочный нейрон, дофаминергический нейрон, срединный шипиковый нейрон, холинергический нейрон, GABA-эргический нейрон, пирамидальный нейрон и т.д.), глияльной клетке (такой как клетка микроглии, макроглии, астроциты, олигодендроциты, клетки эпендимы, радиальной глии и т.д.), клетке паренхимы головного мозга, клетке микроглии, клетке эпендимы и/или клетке Пуркинье. В некоторых вариантах осуществления промотор обеспечивает экспрессию гетерологичной нуклеиновой кислоты в нейроне. В некоторых вариантах осуществления гетерологичная нуклеиновая кислота экспрессируется исключительно в нейронах (например, экспрессируется в нейроне и не экспрессируется в других клетках CNS, таких как клетки глии).

В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает вектор на основе гAAV для применения в способах предупреждения или лечения одного или нескольких дефектов генов (например, наследственных дефектов генов, соматических изменений генов и т.п.) у млекопитающего, таких как, например, дефект гена, приводящий к дефициту полипептида или избытку полипептида у субъекта, или для лечения или уменьшения тяжести или степени дефицита у субъекта, у которого проявляется нарушение, ассоциированное с CNS, связанное с дефицитом таких полипептидов в клетках и тканях. В некоторых вариантах осуществления способы подразумевают введение вектора на основе гAAV, который кодирует один или несколько терапевтических пептидов, полипептидов, функциональных РНК, ингибирующих нуклеиновых кислот, shRNA, микроРНК, антисмысловых нуклеотидов и т.д., в фармацевтически приемлемом носителе субъекту в количестве и в течение периода времени, достаточных для лечения нарушения, ассоциированного с CNS, у субъекта, имеющего такое нарушение или имеющего подозрение на его наличие.

Вектор на основе гAAV может содержать в качестве трансгена нуклеиновую кислоту, кодирующую белок или функциональную РНК, которые обеспечивают модулирование или лечение нарушения, ассоциированного с CNS. Далее следует неограничивающий перечень генов, ассоциированных с нарушениями, ассоциированными с CNS: ген белка, ингибирующего апоптоз нейронов (NAIP), ген фактора роста нервов (NGF), ген глияльного фактора роста (GDNF), ген мозгового фактора роста (BDNF), ген цилиарного нейротрофического фактора (CNTF), тирозингидроксилазы (TH), ген GTP-циклогидролазы (GTPCH), аспартоацилазы (ASPA), ген супероксиддисмутазы (SOD1), ген антиоксиданта, ген антиангиогенного полипептида, ген противовоспалительного полипептида и ген декарбоксилазы аминокислот (AADC). Например, трансен, применимый в лечении болезни Паркинсона, кодирует TH, которая представляет собой скорость-лимитирующий фермент в синтезе дофамина. Трансен, кодирующий GTPCH, которая обеспечивает образование кофактора TH тетрагидробиоптерина, также можно применять в лечении болезни Паркинсона. Трансен, кодирующий GDNF или BDNF или AADC, которая способствует превращению L-Dopa в DA, также можно применять для лечения болезни Паркинсона. Трансен, применимый для лечения ALS, может кодировать GDNF, BDNF или CNTF. Трансен, применимый для лечения ALS, также может кодировать функциональную РНК, например, shRNA, miRNA, которая ингибирует экспрессию SOD1. Трансен, применимый для лечения ишемии, может кодировать NAIP или NGF. Трансен, кодирующий бета-глюкуронидазу (GUS), может быть применимым для лечения определенных лизосомных болезней накопления (например, мукополисахаридоза VII типа (MPS VII)). Трансен, кодирующий продукт гена, активирующий пролекарство, например, тимидинкиназу HSV, превращающую ганцикловир в токсичный нуклеотид, который нарушает синтез ДНК и приводит к гибели клеток, может быть применимым для лечения определенных форм рака, например при введении в комбинации с пролекарством. Трансен, кодирующий эндогенный опиоид, такой как β -эндорфин, может быть применимым для лечения боли. Примеры антиоксидантов включают, без ограничения, SOD1; SOD2; каталазу; сиртуины 1, 3, 4 или 5; NRF2; PGC1 α ; GCL (каталитическую субъединицу); GCL (модифицирующую субъединицу); адипонектин; глутатионпероксидазу 1 и нейроглобин. Примеры антиангиогенных полипептидов включают, без ограничения, ангиостатин, эндостатин, PEDF, растворимый рецептор VEGF и растворимый рецептор PDGF. Примеры противовоспалительных полипептидов включают, без ограничения, IL-10, растворимый IL17R, растворимый TNF-R, TNF-R-Ig, ингибитор IL-1 и ингибитор IL18. Другие примеры трансгенов, которые можно применять в векторах на основе гAAV по настоящему изобретению, будут очевидны специалисту в данной области (см., например, Costantini L.C., et al., Gene Therapy (2000) 7, 93-109).

В некоторых вариантах осуществления терапевтический полипептид или терапевтическую нуклеиновую кислоту применяют для лечения нарушения со стороны CNS. Не желая ограничиваться какой-либо теорией, полагают, что терапевтический полипептид или терапевтическую нуклеиновую кислоту

можно применять для снижения или устранения экспрессии и/или активности полипептида, мутация приобретения функции которого была ассоциирована с нарушением, или для усиления экспрессии и/или активности полипептида с восполнением дефицита, который был ассоциирован с нарушением (например, мутацией гена, экспрессия которого характеризовалась сходной или связанной активностью). Неограничивающие примеры нарушений по настоящему изобретению, которые можно лечить с помощью терапевтического полипептида или терапевтической нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению (иллюстративные гены, на которые можно целенаправленно воздействовать или которые можно предоставлять, приведены в скобках для каждого нарушения), включают инсульт (например, ген каспазы-3, *Beclin1*, *Ask1*, *PAR1*, *HIF1 α* , *PUMA* и/или любой из генов, описанных в Fukuda, A.M. and Badaut, J. (2013) *Genes* (Basel) 4:435-456), болезнь Хантингтона (мутантная форма *HTT*), эпилепсию (например, *SCN1A*, *NMDAR*, *ADK* и/или любой из генов, описанных в Boison, D. (2010) *Epilepsia* 51:1659-1668), болезнь Паркинсона (ген альфа-синуклеина), болезнь Лу Герига (также известную как боковой амиотрофический склероз; *SOD1*), болезнь Альцгеймера (гены тау-белка, белка-предшественника амилоида), кортикобазальную дегенерацию *CBD* (ген тау-белка), кортикобазальную ганглиозную дегенерацию или *CBGD* (ген тау-белка), лобно-височную деменцию или *FTD* (ген тау-белка), прогрессирующий надъядерный паралич или *PSP* (ген тау-белка), множественную системную атрофию или *MSA* (ген альфа-синуклеина), рак головного мозга (например, мутантный или сверхэкспрессируемый онкоген, вовлеченный в рак головного мозга) и лизосомные болезни накопления (*LSD*). Нарушения по настоящему изобретению могут включать нарушения, охватывающие большие зоны коры головного мозга, например, несколько функциональных зон коры головного мозга, несколько долей коры головного мозга и/или всю кору головного мозга. Другие неограничивающие примеры нарушений по настоящему изобретению, которые можно лечить с помощью терапевтического полипептида или терапевтической нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, включают травматическое повреждение головного мозга, нарушения по типу ферментативной дисфункции, нарушения психики (в том числе посттравматический стрессовый синдром), нейродегенеративные заболевания и когнитивные нарушения (в том числе формы деменции, аутизм и депрессию). Нарушения по типу ферментативной дисфункции включают, без ограничения, формы лейкодистрофии (в том числе болезнь Канавана) и любые лизосомные болезни накопления, описанные ниже.

В некоторых вариантах осуществления терапевтический полипептид или терапевтическую нуклеиновую кислоту применяют для лечения лизосомной болезни накопления. Как общеизвестно из уровня техники, лизосомные болезни накопления представляют собой редкие наследственные нарушения метаболизма, характеризующиеся дефектами функций лизосом. Такие нарушения часто вызваны дефицитом фермента, необходимого для правильного метаболизма мукополисахаридов, гликопротеинов и/или липидов, что приводит к патологическому накоплению хранящихся в лизосомах клеточных материалов. Неограничивающие примеры лизосомных болезней накопления по настоящему изобретению, которые можно лечить с помощью терапевтического полипептида или терапевтической нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению (иллюстративные гены, на которые можно целенаправленно воздействовать или которые можно предоставлять, приведены в скобках для каждого нарушения), включают болезнь Гоше 2 типа или 3 типа (ген кислой бета-глюкозидазы, *GBA*), *GM1*-ганглиозидоз (ген бета-галактозидазы-1, *GLB1*), болезнь Хантера (ген идуронат-2-сульфатазы, *IDS*), болезнь Краббе (ген галактозилцерамидазы, *GALC*), заболевание, представляющее собой α -маннозидоз (ген маннозидазы, такой как альфа-D-маннозидаза, *MAN2B1*), заболевание, представляющее собой β -маннозидоз (ген бета-маннозидазы, *MANBA*), заболевание, представляющее собой метахроматическую лейкодистрофию (ген псевдоарилсульфатазы А, *ARSA*), заболевание, представляющее собой муколипидоз II/III типа (ген N-ацетилглюкозамин-1-фосфотрансферазы, *GNPTAB*), болезнь Ниманна-Пика типа А (ген кислой сфингомиелиназы, *ASM*), болезнь Ниманна-Пика типа С (ген белка, связанного с болезнью Ниманна-Пика типа С, *NPC1*), болезнь Помпе (ген кислой альфа-1,4-глюкозидазы, *GAA*), болезнь Сандхоффа (ген бета-субъединицы гексозаминидазы, *HEXB*), болезнь Санфилиппо типа А (ген N-сульфоглюкозаминсульфогидролазы, *MPS3A*), болезнь Санфилиппо типа В (ген N-альфа-ацетилглюкозаминидазы, *NAGLU*), болезнь Санфилиппо типа С (ген гепарин-ацетил-CoA-альфа-глюкозаминид-N-ацетилтрансферазы, *MPS3C*), болезнь Санфилиппо типа D (ген N-ацетилглюкозамин-6-сульфатазы, *GNS*), болезнь Шиндлера (ген альфа-N-ацетилгалактозаминидазы, *NAGA*), болезнь Слая (ген бета-глюкуронидазы, *GUSB*), болезнь Тей-Сакса (ген альфа-субъединицы гексозаминидазы, *HEXA*) и болезнь Вольмана (ген лизосомной кислой липазы, *LIPA*).

Дополнительные лизосомные болезни накопления, а также дефектные ферменты, ассоциированные с каждым заболеванием, перечислены в табл. 1 ниже. В некоторых вариантах осуществления заболевания, перечисленные в таблице ниже, лечат с помощью терапевтического полипептида или терапевтической нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, которые восполняют или иным образом компенсируют соответствующий дефект фермента.

Таблица 1

Лизосомные нарушения накопления и дефектные ферменты, ассоциированные с ними

Лизосомная болезнь накопления	Дефектный фермент
Аспартилглюкозаминурия	Аспартилглюкозаминидаза
Болезнь Фабри	Альфа-галактозидаза А
Инфантильная форма болезни Баттена (CNL1)	Пальмитоилпротеинтиоэстераза
Классическая поздняя инфантильная форма болезни Баттена (CNL2)	Трипептидилпептидаза
Ювенильная форма болезни Баттена (CNL3)	Лизосомный трансмембранный белок
Болезнь Баттена, другие формы (CNL4-CNL8)	Несколько продуктов генов
Цистиноз	Транспортер цистеина
Болезнь Фарбера	Кислая церамидаза
Фукозидоз	Кислая альфа-L-фукозидаза
Галактосиалидоз	Защитный белок/катепсин А
Болезнь Гоше 1, 2 и 3 типов	Кислая бета-глюкозидаза
GM1-ганглиозидоз	Кислая бета-галактозидаза
Болезнь Хантера	Идуронат-2-сульфатаза
Болезнь Гурлер-Шейе	Альфа-L-идуронидаза
Болезнь Краббе	Галактоцереброзидаза
Альфа-маннозидоз	Кислая альфа-маннозидаза
Бета-маннозидоз	Кислая бета-маннозидаза
Болезнь Марото-Лами	Арилсульфатаза В
Метахроматическая лейкодистрофия	Арилсульфатаза А
Болезнь Моркио типа А	N-ацетилгалактозамин-6-сульфатаза
Болезнь Моркио типа В	Кислая бета-галактозидаза
Муколипидоз II/III типа	N-ацетилглюкозамин-1-фосфотрансфераза
Болезнь Ниманна-Пика типа А, В	Кислая сфингомиелиназа
Болезнь Ниманна-Пика типа С	NPC-1
Болезнь Помпе	Кислая альфа-глюкозидаза
Болезнь Сандхоффа	Бета-гексозаминидаза В
Болезнь Санфилиппо типа А	Гепаран-N-сульфатаза
Болезнь Санфилиппо типа В	Альфа-N-ацетилглюкозаминидаза
Болезнь Санфилиппо типа С	Ацетил-СоА-альфа-глюкозаминид-N-ацетилтрансфераза
Болезнь Санфилиппо типа D	N-ацетилглюкозамин-6-сульфатаза
Болезнь Шиндлера	Альфа-N-ацетилгалактозаминидаза
Болезнь Канзаки-Шиндлера	Альфа-N-ацетилгалактозаминидаза
Сиалидоз	Альфа-нейраминидаза
Болезнь Слая	Бета-глюкуронидаза
Болезнь Тея-Сакса	Бета-гексозаминидаза А
Болезнь Вольмана	Кислая липаза

Болезнь Хантингтона.

Одним примером заболевания, при котором такие векторы могут быть преимущественными, является болезнь Хантингтона (HD), вызываемая мутацией по типу экспансии повтора CAG, который кодирует экспандированный полиглутаминовый (поли-Q) повтор в мутантном белке хантингтине (mHTT). HD представляет собой привлекательную мишень для средств терапии на основе ДНК и РНК, поскольку она является аутосомно-доминантным заболеванием, обусловленным мутацией одного аллеля. Векторы на основе AAV могут представлять собой превосходную систему доставки для терапевтических средств

на основе нуклеиновых кислот и будут обеспечивать длительную и непрерывную экспрессию этих молекул, понижающих уровень хантингтина, в головном мозге.

Как описано в данном документе, при внутримозговом введении частиц гAAV (например, терапевтического вектора), имеющих капсидный белок гAAV, содержащий одну или несколько аминокислотных замен в одном или нескольких положениях, в которых происходит взаимодействие с гепарансульфатсодержащим протеогликаном, достигают обширной трансдукции нейронов. Соответственно, аспекты настоящего изобретения предусматривают способы доставки гетерологичной нуклеиновой кислоты в центральную нервную систему с помощью рекомбинантных вирусных частиц, описанных в данном документе, для лечения болезни Хантингтона. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает способы и композиции для лечения болезни Хантингтона у индивидуума, предусматривающие введение млекопитающему фармацевтической композиции по настоящему раскрытию (например, фармацевтической композиции, содержащей вариант вирусной частицы по настоящему раскрытию). В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает способы и композиции для ингибирования экспрессии Htt у млекопитающего с болезнью Хантингтона, предусматривающие введение индивидууму фармацевтической композиции по настоящему раскрытию (например, фармацевтической композиции, содержащей вариант вирусной частицы по настоящему раскрытию). В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает способы и композиции для ингибирования накопления Htt в клетке индивидуума с болезнью Хантингтона, предусматривающие введение индивидууму фармацевтической композиции по настоящему раскрытию (например, фармацевтической композиции, содержащей вариант вирусной частицы по настоящему раскрытию).

В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает способы и композиции для уменьшения интенсивности симптома HD у индивидуума, включающие введение эффективного количества рекомбинантных вирусных частиц, содержащих одну или несколько аминокислотных замен в одном или нескольких положениях, в которых происходит взаимодействие с гепарансульфатсодержащим протеогликаном, в CNS индивидуума, где частицы гAAV содержат вектор, кодирующий средство для RNAi, которое ингибирует экспрессию и/или накопление НТТ у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления симптомы HD включают, без ограничения, хорею, ригидность, неконтролируемые телодвижения, потерю контроля над мышцами, отсутствие координации движений, беспокойство, замедление движений глаз, аномальное застывание в определенной позе, неустойчивость, атаксическую походку, аномальное выражение лица, проблемы с речью, затрудненное жевание и/или глотание, нарушение сна, эпилептические припадки, деменцию, когнитивные расстройства (например, ослабление способностей, связанных с планированием, абстрактным мышлением, гибкостью, усвоением правил, межличностной восприимчивостью, самоконтролем, вниманием, обучением и памятью), депрессию, тревожность, изменения личности, агрессивность, компульсивное поведение, обсессивно-компульсивное поведение, гиперсексуальность, психоз, апатию, раздражительность, суицидальные мысли, потерю в весе, атрофию мышц, сердечную недостаточность, снижение толерантности к глюкозе, атрофию яичек и остеопороз.

В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает способы предупреждения или замедления прогрессирования HD. Аутосомно-доминантная HD представляет собой генетическое заболевание, которое можно генотипировать. Например, число повторов CAG в НТТ можно определить посредством установления размера повтора с использованием ПЦР. Диагностику этого типа можно проводить на любой стадии жизни путем непосредственного тестирования подростков или взрослых (например, на фоне проявления клинических симптомов), пренатального скрининга или пренатального тестирования методом исключения (например, путем взятия пробы ворсинчатого хориона или амниоцентеза) или предимплантационного скрининга эмбрионов. В дополнение, HD можно диагностировать путем визуализации головного мозга, выявляя уменьшение размеров хвостатого ядра и/или скорлупы чечевицеобразного ядра и/или увеличение желудочков. Эти симптомы в комбинации с HD в семейном анамнезе и/или клиническими симптомами могут указывать на HD.

Средства для определения уменьшения интенсивности симптомов HD известны из уровня техники. Например, для оценки двигательной функции, когнитивной функции, поведенческих аномалий и функциональной способности можно применять унифицированную шкалу оценки болезни Хантингтона (UH-DRS) (см., например, Huntington Study Group (1996) Movement Disorders 11:136-42). Эта шкала оценки была разработана для обеспечения универсального всестороннего теста для нескольких аспектов патологии, связанной с заболеванием, включающего элементы таких тестов, как шкала оценки активности и повседневной жизни при HD, шкала оценки тяжести хореи Марсдена-Квинна, шкалы оценки нетрудоспособности и физической независимости, шкала оценки двигательной функции при HD (HDMRS), шкала оценки функциональной способности при HD (HDFCS) и количественное неврологическое исследование (QNE).

Другие тесты, применимые для определения уменьшения интенсивности симптомов HD, могут включать, без ограничения, монреальскую шкалу оценки когнитивных функций, визуализацию головного мозга (например, MRI), тест на скорость определения категорий, тест с построением маршрута, тест поиска по карте, тест на чтение слов Струпа, тест "постукивания" с выполнением задания в ускоренном режиме и тест на сопоставление символов и цифр.

В некоторых аспектах настоящего изобретения способы и композиции применяют для лечения людей с HD. Как описано выше, HD наследуется по аутосомно-доминантному типу и вызывается экспансией повтора CAG в гене HTT. Ювенильная HD чаще всего наследуется по отцовской линии. Фенотипы, сходные с фенотипом болезни Хантингтона, также коррелировали с другими генными локусами, такими как HDL1, PRNP, HDL2, HDL3 и HDL4. Полагают, что другие генные локусы могут модифицировать проявление симптомов HD, в том числе мутаций в генах GRIN2A, GRIN2B, MSX1, GRIK2 и APOE.

Композиции на основе гAAV.

В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает композиции, содержащие какие-либо частицы гAAV, описанные в данном документе. Как правило, композиции для применения в способах и системах по настоящему изобретению содержат эффективное количество частиц гAAV, содержащих векторы на основе гAAV, кодирующие полипептид и/или РНК, необязательно в фармацевтически приемлемом наполнителе. Вирусные частицы содержат капсид AAV (например, капсид AAV2 или AAVrh8R), где одна или несколько аминокислот, которые взаимодействуют с HSPG, заменены таким образом, что связывание частиц гAAV с HSPG ослаблено или устранено. Как хорошо известно из уровня техники, фармацевтически приемлемые наполнители представляют собой относительно инертные вещества, облегчающие введение фармакологически эффективного вещества, и могут поставляться в виде жидких растворов или суспензий, в виде эмульсий или в виде твердых форм, подходящих для растворения или суспендирования в жидкости перед применением. Например, наполнитель может придавать форму или консистенцию или выступать в качестве разбавителя. Подходящие наполнители включают, без ограничения, стабилизаторы, смачивающие и эмульгирующие средства, соли для изменения осмолярности, инкапсулирующие средства, буферные вещества для поддержания pH и буферы. Такие наполнители включают любое фармацевтическое средство, подходящее для прямой доставки в глаз, которое можно вводить без излишней токсичности. Фармацевтически приемлемые наполнители включают, без ограничения, сорбит, любое из различных соединений TWEEN и жидкости, такие как вода, физиологический раствор, глицерин и этанол. В них могут быть включены фармацевтически приемлемые соли, например, соли минеральных кислот, такие как гидрохлориды, гидробромиды, фосфаты, сульфаты и т.п.; и соли органических кислот, такие как ацетаты, пропионаты, малонаты, бензоаты и т.п. Всестороннее обсуждение фармацевтически приемлемых наполнителей доступно в REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Mack Pub. Co., N.J. 1991).

Как правило, эти композиции составляют для введения путем субретинальной инъекции. Соответственно, эти композиции можно объединять с фармацевтически приемлемыми основами, такими как физиологический раствор, сбалансированный солевой раствор Рингера (pH 7,4) и т.п. Хотя это и не требуется, композиции необязательно могут поставляться в виде стандартной лекарственной формы, подходящей для введения точного количества.

Способы субретинальной доставки гAAV.

Способы субретинальной доставки известны из уровня техники. Например, см. WO 2009/105690, включенную в данный документ посредством ссылки. Вкратце, общий способ доставки частиц гAAV (например, частиц гAAV2, гAAVrh8R и т.д.) в субретинальную область желтого пятна и центральной ямки можно проиллюстрировать следующим кратким обзором. Этот пример направлен лишь на иллюстрацию определенных признаков способа и никаким образом не подразумевается как ограничивающий.

Как правило, вектор на основе гAAV можно доставлять в форме композиции, вводимой путем внутриглазной инъекции (субретинально), при непосредственном наблюдении с помощью операционного микроскопа. В некоторых вариантах осуществления вектор инкапсидирован в частице гAAV, где частица гAAV содержит капсид гAAV, содержащий капсидные белки гAAV, содержащие одну или несколько аминокислотных замен в одном или нескольких положениях, в которых происходит взаимодействие с гепарансульфатсодержащим протеогликаном (например, ингибирующих или устраняющих связывание с HSPG), и вектор на основе гAAV, содержащий гетерологичную нуклеиновую кислоту и по меньшей мере один инвертированный концевой повтор AAV. Данная процедура может включать удаление стекловидного тела с последующей инъекцией суспензии вектора на основе гAAV в субретинальное пространство при помощи тонкой канюли через один или несколько небольших разрезов сетчатки.

Вкратце, инфузионную канюлю можно закреплять швом на месте для поддержания нормального объема глазного яблока путем инфузии (например, физиологического раствора) на протяжении всей операции. Удаление стекловидного тела проводят при помощи канюли с подходящим размером канала (например, 20-27 калибра), где объем удаляемого гелеобразного стекловидного тела замещают путем инфузии физиологического раствора или другого изотонического раствора из инфузионной канюли. Преимущественно проводят удаление стекловидного тела, поскольку (1) удаление его коркового слоя (задней гиалоидной мембраны) облегчает проникновение канюли в сетчатку; (2) его удаление и замещение жидкостью (например, физиологическим раствором) создает пространство для обеспечения внутриглазной инъекции вектора, и (3) его контролируемое удаление снижает вероятность разрывов сетчатки и незапланированного отслоения сетчатки.

В некоторых вариантах осуществления композицию на основе гAAV вводят путем прямой инъекции в субретинальное пространство за пределами центральной зоны сетчатки при использовании канюли

с подходящим размером канала (например, 27-45 калибра), создавая таким образом пузырек в субретинальном пространстве. В других вариантах осуществления субретинальной инъекции композиции на основе гAAV предшествует субретинальная инъекция небольшого объема (например, от приблизительно 0,1 до приблизительно 0,5 мл) подходящей жидкости (такой как физиологический раствор или раствор Рингера) в субретинальное пространство за пределами центральной зоны сетчатки. Посредством этой первоначальной инъекции в субретинальное пространство в субретинальном пространстве формируется первоначальный пузырек жидкости, что вызывает локальное отслоение сетчатки в месте расположения первоначального пузырька. Этот первоначальный пузырек жидкости может облегчать целенаправленную доставку композиции на основе гAAV в субретинальное пространство (посредством определения плоскости инъекции перед доставкой гAAV) и обеспечивать сведение к минимуму возможности введения гAAV в сосудистую оболочку глаза и вероятности инъекции или обратного тока гAAV в полость стекловидного тела. В некоторых вариантах осуществления в этот первоначальный пузырек жидкости можно дополнительно вводить путем инъекции жидкости, содержащие одну или несколько композиций на основе гAAV и/или одно или несколько дополнительных терапевтических средств, посредством введения этих жидкостей непосредственно в первоначальный пузырек жидкости при помощи тех же самых или дополнительных узких канюль.

Внутриглазное введение композиций на основе гAAV и/или первоначального небольшого объема жидкости можно проводить при помощи тонкой канюли (например, 27-45 калибра), прикрепленной к шприцу. В некоторых вариантах осуществления поршень этого шприца может управляться механическим устройством, как, например, путем нажатия на ножную педаль. Благодаря проведению склеротомии тонкую канюлю продвигают через полость стекловидного тела в участок сетчатки, предварительно определенный для каждого субъекта в соответствии с зоной сетчатки, подлежащей целенаправленному воздействию (но за пределами центральной зоны сетчатки). При непосредственной визуализации суспензию вектора вводят путем механической инъекции под нейросенсорную часть сетчатки, что вызывает локальное отслоение сетчатки с самозатягивающимся нерасширяющимся разрезом сетчатки. Как отмечено выше, композицию на основе гAAV можно вводить путем прямой инъекции в субретинальное пространство, создавая пузырек за пределами центральной зоны сетчатки, либо вектор можно вводить путем инъекции в первоначальный пузырек за пределами центральной зоны сетчатки, вызывая его расширение (и расширение зоны отслоения сетчатки). В некоторых вариантах осуществления за инъекцией композиции на основе гAAV следует инъекция другой жидкости в пузырек.

Не желая ограничиваться какой-либо теорией, полагают, что скорость и место субретинальной(субретинальных) инъекции(инъекций) могут обуславливать возникновение локальных сил сдвига, которые могут повреждать желтое пятно, центральную ямку и/или нижележащие клетки RPE. Субретинальные инъекции можно проводить при скорости, при которой силы сдвига сводятся к минимуму или исключаются. В некоторых вариантах осуществления композицию на основе гAAV вводят путем инъекции в течение приблизительно 15-17 минут. В некоторых вариантах осуществления вектор вводят путем инъекции в течение приблизительно 17-20 минут. В некоторых вариантах осуществления композицию на основе гAAV вводят путем инъекции в течение приблизительно 20-22 минут. В некоторых вариантах осуществления композицию на основе гAAV вводят путем инъекции при скорости от приблизительно 35 до приблизительно 65 мкл/мин. В некоторых вариантах осуществления композицию на основе гAAV вводят путем инъекции при скорости приблизительно 35 мкл/мин. В некоторых вариантах осуществления композицию на основе гAAV вводят путем инъекции при скорости приблизительно 40 мкл/мин. В некоторых вариантах осуществления композицию на основе гAAV вводят путем инъекции при скорости приблизительно 45 мкл/мин. В некоторых вариантах осуществления композицию на основе гAAV вводят путем инъекции при скорости приблизительно 50 мкл/мин. В некоторых вариантах осуществления композицию на основе гAAV вводят путем инъекции при скорости приблизительно 55 мкл/мин. В некоторых вариантах осуществления композицию на основе гAAV вводят путем инъекции при скорости приблизительно 60 мкл/мин. В некоторых вариантах осуществления композицию на основе гAAV вводят путем инъекции при скорости приблизительно 65 мкл/мин. Среднему специалисту в данной области будет понятно, что скорость и продолжительность инъекции в пузырек может определяться, например, объемом композиции на основе гAAV или размером пузырька, необходимым для создания достаточного отслоения сетчатки для получения доступа к клеткам центральной зоны сетчатки, размером канюли, применяемой для доставки композиции на основе гAAV, и возможностью безопасного сохранения положения канюли по настоящему изобретению.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения объем композиции, вводимой путем инъекции в субретинальное пространство сетчатки, превышает приблизительно любое количество из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 мкл или 1 мл или любое количество между ними.

В некоторых вариантах осуществления способы включают введение в глаз (например, путем субретинального и/или интравитреального введения) эффективного количества рекомбинантных вирусных частиц, содержащих одну или несколько аминокислотных замен в одном или нескольких положениях, в которых происходит взаимодействие с гепарансульфатсодержащим протеогликаном, содержащих век-

тор, кодирующий гетерологичную нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления вирусный титр в композиции имеет по меньшей мере приблизительно любое значение из 5×10^{12} , 6×10^{12} , 7×10^{12} , 8×10^{12} , 9×10^{12} , 10×10^{12} , 11×10^{12} , 15×10^{12} , 20×10^{12} , 25×10^{12} , 30×10^{12} или 50×10^{12} копий генома/мл. В некоторых вариантах осуществления вирусный титр в композиции имеет приблизительно любое значение из от 5×10^{12} до 6×10^{12} , от 6×10^{12} до 7×10^{12} , от 7×10^{12} до 8×10^{12} , от 8×10^{12} до 9×10^{12} , от 9×10^{12} до 10×10^{12} , от 10×10^{12} до 11×10^{12} , от 11×10^{12} до 15×10^{12} , от 15×10^{12} до 20×10^{12} , от 20×10^{12} до 25×10^{12} , от 25×10^{12} до 30×10^{12} , от 30×10^{12} до 50×10^{12} или от 50×10^{12} до 100×10^{12} копий генома/мл. В некоторых вариантах осуществления вирусный титр в композиции имеет приблизительно любое значение из от 5×10^{12} до 10×10^{12} , от 10×10^{12} до 25×10^{12} или от 25×10^{12} до 50×10^{12} копий генома/мл. В некоторых вариантах осуществления вирусный титр в композиции имеет по меньшей мере приблизительно любое значение из 5×10^9 , 6×10^9 , 7×10^9 , 8×10^9 , 9×10^9 , 10×10^9 , 11×10^9 , 15×10^9 , 20×10^9 , 25×10^9 , 30×10^9 или 50×10^9 трансдуцирующих единиц/мл. В некоторых вариантах осуществления вирусный титр в композиции имеет приблизительно любое значение из от 5×10^9 до 6×10^9 , от 6×10^9 до 7×10^9 , от 7×10^9 до 8×10^9 , от 8×10^9 до 9×10^9 , от 9×10^9 до 10×10^9 , от 10×10^9 до 11×10^9 , от 11×10^9 до 15×10^9 , от 15×10^9 до 20×10^9 , от 20×10^9 до 25×10^9 , от 25×10^9 до 30×10^9 , от 30×10^9 до 50×10^9 или от 50×10^9 до 100×10^9 трансдуцирующих единиц/мл. В некоторых вариантах осуществления вирусный титр в композиции имеет приблизительно любое значение из от 5×10^9 до 10×10^9 , от 10×10^9 до 15×10^9 , от 15×10^9 до 25×10^9 или от 25×10^9 до 50×10^9 трансдуцирующих единиц/мл. В некоторых вариантах осуществления вирусный титр в композиции имеет по меньшей мере приблизительно любое значение из 5×10^{10} , 6×10^{10} , 7×10^{10} , 8×10^{10} , 9×10^{10} , 10×10^{10} , 11×10^{10} , 15×10^{10} , 20×10^{10} , 25×10^{10} , 30×10^{10} , 40×10^{10} или 50×10^{10} инфекционных единиц/мл. В некоторых вариантах осуществления вирусный титр в композиции имеет по меньшей мере приблизительно любое значение из от 5×10^{10} до 6×10^{10} , от 6×10^{10} до 7×10^{10} , от 7×10^{10} до 8×10^{10} , от 8×10^{10} до 9×10^{10} , от 9×10^{10} до 10×10^{10} , от 10×10^{10} до 11×10^{10} , от 11×10^{10} до 15×10^{10} , от 15×10^{10} до 20×10^{10} , от 20×10^{10} до 25×10^{10} , от 25×10^{10} до 30×10^{10} , от 30×10^{10} до 40×10^{10} , от 40×10^{10} до 50×10^{10} или от 50×10^{10} до 100×10^{10} инфекционных единиц/мл. В некоторых вариантах осуществления вирусный титр в композиции имеет по меньшей мере приблизительно любое значение из от 5×10^{10} до 10×10^{10} , от 10×10^{10} до 15×10^{10} , от 15×10^{10} до 25×10^{10} или от 25×10^{10} до 50×10^{10} инфекционных единиц/мл.

В некоторых вариантах осуществления способы включают введение в глаз (например, путем субретинального и/или интравитреального введения) индивидуума (например, человека) эффективного количества рекомбинантных вирусных частиц, содержащих одну или несколько аминокислотных замен в одном или нескольких положениях, в которых происходит взаимодействие с гепарансульфатсодержащим протеогликаном. В некоторых вариантах осуществления доза вирусных частиц, вводимых индивидууму, имеет по меньшей мере любое значение из от приблизительно 1×10^8 до приблизительно 1×10^{13} копий генома/кг веса тела. В некоторых вариантах осуществления доза вирусных частиц, вводимых индивидууму, имеет любое значение от приблизительно 1×10^8 до приблизительно 1×10^{13} копий генома/кг веса тела.

Можно создать один или несколько (например, 2, 3 или более) пузырьков. Как правило, общий объем пузырька или пузырьков, создаваемых с помощью способов и систем по настоящему изобретению, не может превышать объем жидкости в глазу, например, приблизительно 4 мл у типичного субъекта-человека. Общий объем каждого отдельного пузырька может составлять по меньшей мере приблизительно 0,3 мл или по меньшей мере приблизительно 0,5 мл для обеспечения отслоения сетчатки достаточного размера для обнажения типов клеток центральной зоны сетчатки и создания пузырька с достаточной способностью к оседанию для оптимальных действий. Среднему специалисту в данной области будет понятно, что при создании пузырька согласно способам и системам по настоящему изобретению необходимо поддерживать соответствующее внутриглазное давление во избежание повреждения структур глаза. Размер каждого отдельного пузырька может составлять, например, от приблизительно 0,5 до приблизительно 1,2 мл, от приблизительно 0,8 до приблизительно 1,2 мл, от приблизительно 0,9 до приблизительно 1,2 мл, от приблизительно 0,9 до приблизительно 1,0 мл, от приблизительно 1,0 до приблизительно 2,0 мл, от приблизительно 1,0 до приблизительно 3,0 мл. Таким образом, в одном примере для инъекции в общей сложности 3 мл суспензии композиции на основе gAAV можно сформировать 3 пузырька приблизительно по 1 мл каждый. Общий объем всех пузырьков в комбинации может составлять, например, от приблизительно 0,5 до приблизительно 3,0 мл, от приблизительно 0,8 до приблизительно 3,0 мл, от приблизительно 0,9 до приблизительно 3,0 мл, от приблизительно 1,0 до приблизительно 3,0 мл, от приблизительно 0,5 до приблизительно 1,5 мл, от приблизительно 0,5 до приблизительно 1,2 мл, от приблизительно 0,9 до приблизительно 3,0 мл, от приблизительно 0,9 до приблизительно 2,0 мл, от приблизительно 0,9 до приблизительно 1,0 мл.

В целях безопасной и эффективной трансдукции в целевых зонах сетчатки (например, в центральной зоне сетчатки) за пределами границ исходного расположения пузырька пузырек можно подвергнуть действиям по перемещению пузырька в целевую зону для трансдукции. Действия с пузырьком могут происходить благодаря способности пузырька к оседанию, создаваемой объемом пузырька, посредством перемещения глаза, содержащего пузырек, перемещения головы человека с глазом или глазами, содержащими один или несколько пузырьков, и/или путем обмена жидкость-воздух. Это особенно относится к

центральной зоне сетчатки, поскольку эта зона обычно является устойчивой к отслоению в результате субретинальной инъекции. В некоторых вариантах осуществления для перемещения пузырька используют обмен жидкость-воздух; жидкость из инфузионной канюли временно заменяют воздухом, например, воздухом, выдуваемым на поверхность сетчатки. Поскольку объем воздуха вытесняет жидкость полости стекловидного тела с поверхности сетчатки, жидкость из полости стекловидного тела может вытекать из канюли. Временное отсутствие давления жидкости полости стекловидного тела вызывает движение и перемещение пузырька под действием силы тяжести в нижнюю часть глаза. С пузырьком с субретинально введенной композицией на основе gAAV производят действия для охвата прилегающих зон (например, желтого пятна и/или центральной ямки) посредством соответствующего размещения глазного яблока. В некоторых случаях масса пузырька является достаточной, чтобы вызвать его перемещение под действием силы тяжести даже без применения обмена жидкость-воздух. Движение пузырька в желаемое местоположение можно дополнительно облегчить путем изменения положения головы субъекта для того, чтобы позволить пузырьку переместиться под действием силы тяжести в желаемое местоположение в глазу. По достижении желаемой конфигурации пузырька жидкость возвращают в полость стекловидного тела. Жидкость представляет собой подходящую жидкость, например, свежеприготовленный физиологический раствор. Как правило, субретинально введенную композицию на основе gAAV можно оставить *in situ* без ретинопексии разреза сетчатки и без внутриглазной тампонады, и сетчатка самопроизвольно повторно прикрепляется в течение приблизительно 48 ч.

Благодаря безопасной и эффективной трансдукции клеток глаза (например, RPE и/или фоторецепторных клеток, например, желтого пятна и/или центральной ямки) вектором, содержащим последовательность терапевтического полипептида или РНК, способы по настоящему изобретению можно применять для лечения индивидуума; например, человека, имеющего глазное нарушение, где трансдуцированные клетки вырабатывают последовательность терапевтического полипептида или РНК в количестве, достаточном для лечения глазного нарушения. В некоторых вариантах осуществления трансдукцию клеток глаза улучшают путем применения частиц gAAV (например, частиц gAAV2, gAAVrh8R и т.д.), содержащих капсидные белки AAV, содержащие одну или несколько замен аминокислот, которые взаимодействуют с HSPG (например, ингибируют или устраняют связывание с HSPG). В некоторых вариантах осуществления частицы gAAV демонстрируют ослабленное связывание с HSPG; например, ослабленное более чем на приблизительно 10, 25, 50, 75, 100% или любое число между ними. В некоторых вариантах осуществления связывание gAAV с HSPG ослаблено на от приблизительно 5% до приблизительно 100%, на от приблизительно 10% до приблизительно 50%, на от приблизительно 10% до приблизительно 30%, на от приблизительно 25% до приблизительно 75%, на от приблизительно 25% до приблизительно 50% или на от приблизительно 30% до приблизительно 50%.

Эффективное количество gAAV (в некоторых вариантах осуществления в форме частиц) вводят в зависимости от целей лечения. Например, если при низком процентном значении трансдукции можно достичь желаемого терапевтического эффекта, то целью лечения, как правило, является соответствие этому уровню трансдукции или его превышение. В некоторых случаях этого уровня трансдукции можно достичь путем трансдукции лишь приблизительно 1-5% клеток-мишеней, в некоторых вариантах осуществления по меньшей мере приблизительно 20% клеток желаемого типа ткани, в некоторых вариантах осуществления по меньшей мере приблизительно 50%, в некоторых вариантах осуществления по меньшей мере приблизительно 80%, в некоторых вариантах осуществления по меньшей мере приблизительно 95%, в некоторых вариантах осуществления по меньшей мере приблизительно 99% клеток желаемого типа ткани. Как обсуждается выше, замена одной или нескольких аминокислот капсида gAAV, которые взаимодействуют с HSPG, улучшает трансдукцию, опосредованную gAAV. В качестве руководства, число частиц, вводимых в расчете на одну инъекцию, как правило, составляет от приблизительно 1×10^6 до приблизительно 1×10^{14} частиц, от приблизительно 1×10^7 до 1×10^{13} частиц, от приблизительно 1×10^9 до 1×10^{12} частиц или приблизительно 1×10^{11} частиц. Композицию на основе gAAV можно вводить путем одной или нескольких субретинальных инъекций, производимых в ходе одной и той же процедуры или разделенных несколькими днями, неделями, месяцами или годами. В некоторых вариантах осуществления для лечения человека можно применять несколько векторов.

В некоторых вариантах осуществления посредством введения в сетчатку эффективного количества вирусных частиц gAAV, содержащих капсид gAAV с одной или несколькими заменами аминокислот, которые взаимодействуют с HSPG, осуществляют трансдукцию фоторецепторных клеток в месте введения или около него. В некоторых вариантах осуществления показатель трансдукции фоторецепторных клеток превышает приблизительно любое значение из 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 или 100%. В некоторых вариантах осуществления от приблизительно 5% до приблизительно 100%, от приблизительно 10% до приблизительно 50%, от приблизительно 10% до приблизительно 30%, от приблизительно 25% до приблизительно 75%, от приблизительно 25% до приблизительно 50% или от приблизительно 30% до приблизительно 50% фоторецепторных клеток являются трансдуцированными. Способы идентификации фоторецепторных клеток, трансдуцированных вирусными частицами AAV, содержащими капсид gAAV с одной или несколькими заменами аминокислот, которые взаимодействуют с HSPG, известны из уровня техники; например, можно применять иммуногистохимический анализ или

применение маркера, такого как усиленный зеленый флуоресцентный белок, для выявления трансдукции вирусными частицами, содержащими капсид gAAV с одной или несколькими заменами аминокислот, которые взаимодействуют с HSPG.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения способы включают введение в субретинальную область (например, в субретинальное пространство) млекопитающего эффективного количества частиц вируса AAV, при этом вирусные частицы содержат капсид gAAV с одной или несколькими заменами аминокислот, которые взаимодействуют с HSPG, для лечения индивидуума с глазным нарушением; например, человека с глазным нарушением. В некоторых вариантах осуществления композицию вводят путем инъекции в одно или несколько местоположений в субретинальной области для обеспечения экспрессии гетерологичной нуклеиновой кислоты в фоторецепторных клетках. В некоторых вариантах осуществления композицию вводят путем инъекции в любое из одного, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти, десяти или более десяти местоположений в субретинальной области.

В некоторых вариантах осуществления вирусные частицы gAAV, содержащие капсид gAAV с одной или несколькими заменами аминокислот, которые взаимодействуют с HSPG, вводят в несколько местоположений одновременно или последовательно. В некоторых вариантах осуществления многократные инъекции вирусных частиц gAAV проводят с интервалом не более чем в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 12 или 24 ч.

Способы интравитреальной инъекции.

Общий способ интравитреальной инъекции можно проиллюстрировать следующим кратким обзором. Этот пример направлен лишь на иллюстрацию определенных признаков способа и никаким образом не подразумевается как ограничивающий. Процедуры интравитреальной инъекции известны из уровня техники (см., например, Peyman, G.A., et al. (2009) *Retina* 29(7):875-912 и Fagan, X.J. and Al-Qureshi, S. (2013) *Clin. Experiment. Ophthalmol.* 41(5):500-7).

Вкратце, субъекта можно подготовить к процедуре интравитреальной инъекции путем расширения зрачков, стерилизации глаза и введения анестетика. Для расширения зрачков можно применять любое подходящее мидриатическое средство, известное в данной области техники. Перед лечением можно подтвердить надлежащее расширение зрачков. Стерилизацию можно осуществлять путем применения стерилизующей обработки глаза, например, йодидсодержащего раствора, такого как повидон-йод (BETADINE®). Аналогичный раствор также можно применять для очистки века, ресниц и любых других соседних тканей (например, кожи). Можно применять любой подходящий анестетик, такой как лидокаин или пропаракаин, в любой подходящей концентрации. Анестетик можно вводить с помощью любого способа, известного из уровня техники, в том числе, без ограничения, в составе капель, гелей или желе местного действия и путем субконъюнктивального применения анестетика.

Перед инъекцией можно применять стерилизованный векорасширитель для удаления ресниц от зоны. Место инъекции можно отметить шприцем. Место инъекции можно выбрать в зависимости от хрусталика пациента. Например, место инъекции может находиться на расстоянии 3-3,5 мм от лимба роговицы у пациентов с псевдофакичным или афакичным глазом и на расстоянии 3,5-4 мм от лимба роговицы у пациентов с факичным глазом. Пациент может смотреть в сторону, противоположную месту инъекции.

В некоторых вариантах осуществления способы включают введение в глаз (например, путем субретинального и/или интравитреального введения) эффективного количества рекомбинантных вирусных частиц, содержащих одну или несколько аминокислотных замен в одном или нескольких положениях, в которых происходит взаимодействие с гепарансульфатсодержащим протеогликаном, содержащих вектор, кодирующий гетерологичную нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления вирусный титр в композиции имеет по меньшей мере приблизительно любое значение из 5×10^{12} , 6×10^{12} , 7×10^{12} , 8×10^{12} , 9×10^{12} , 10×10^{12} , 11×10^{12} , 15×10^{12} , 20×10^{12} , 25×10^{12} , 30×10^{12} или 50×10^{12} копий генома/мл. В некоторых вариантах осуществления вирусный титр в композиции имеет приблизительно любое значение из от 5×10^{12} до 6×10^{12} , от 6×10^{12} до 7×10^{12} , от 7×10^{12} до 8×10^{12} , от 8×10^{12} до 9×10^{12} , от 9×10^{12} до 10×10^{12} , от 10×10^{12} до 11×10^{12} , от 11×10^{12} до 15×10^{12} , от 15×10^{12} до 20×10^{12} , от 20×10^{12} до 25×10^{12} , от 25×10^{12} до 30×10^{12} , от 30×10^{12} до 50×10^{12} или от 50×10^{12} до 100×10^{12} копий генома/мл. В некоторых вариантах осуществления вирусный титр в композиции имеет приблизительно любое значение из от 5×10^{12} до 10×10^{12} , от 10×10^{12} до 25×10^{12} или от 25×10^{12} до 50×10^{12} копий генома/мл. В некоторых вариантах осуществления вирусный титр в композиции имеет по меньшей мере приблизительно любое значение из 5×10^9 , 6×10^9 , 7×10^9 , 8×10^9 , 9×10^9 , 10×10^9 , 11×10^9 , 15×10^9 , 20×10^9 , 25×10^9 , 30×10^9 или 50×10^9 трансдуцирующих единиц/мл. В некоторых вариантах осуществления вирусный титр в композиции имеет приблизительно любое значение из от 5×10^9 до 6×10^9 , от 6×10^9 до 7×10^9 , от 7×10^9 до 8×10^9 , от 8×10^9 до 9×10^9 , от 9×10^9 до 10×10^9 , от 10×10^9 до 11×10^9 , от 11×10^9 до 15×10^9 , от 15×10^9 до 20×10^9 , от 20×10^9 до 25×10^9 , от 25×10^9 до 30×10^9 , от 30×10^9 до 50×10^9 или от 50×10^9 до 100×10^9 трансдуцирующих единиц/мл. В некоторых вариантах осуществления вирусный титр в композиции имеет приблизительно любое значение из от 5×10^9 до 10×10^9 , от 10×10^9 до 15×10^9 , от 15×10^9 до 25×10^9 или от 25×10^9 до 50×10^9 трансдуцирующих единиц/мл. В некоторых вариантах осуществления вирусный титр в композиции имеет по меньшей мере приблизительно любое значение из 5×10^{10} , 6×10^{10} , 7×10^{10} , 8×10^{10} , 9×10^{10} , 10×10^{10} , 11×10^{10} , 15×10^{10} , 20×10^{10} , 25×10^{10} , 30×10^{10} , 40×10^{10} или 50×10^{10} инфекционных единиц/мл. В некоторых вариантах осуществ-

ствления вирусный титр в композиции имеет по меньшей мере приблизительно любое значение из от 5×10^{10} до 6×10^{10} , от 6×10^{10} до 7×10^{10} , от 7×10^{10} до 8×10^{10} , от 8×10^{10} до 9×10^{10} , от 9×10^{10} до 10×10^{10} , от 10×10^{10} до 11×10^{10} , от 11×10^{10} до 15×10^{10} , от 15×10^{10} до 20×10^{10} , от 20×10^{10} до 25×10^{10} , от 25×10^{10} до 30×10^{10} , от 30×10^{10} до 40×10^{10} , от 40×10^{10} до 50×10^{10} или от 50×10^{10} до 100×10^{10} инфекционных единиц/мл. В некоторых вариантах осуществления вирусный титр в композиции имеет по меньшей мере приблизительно любое значение из от 5×10^{10} до 10×10^{10} , от 10×10^{10} до 15×10^{10} , от 15×10^{10} до 25×10^{10} или от 25×10^{10} до 50×10^{10} инфекционных единиц/мл.

В некоторых вариантах осуществления способы включают введение в глаз (например, путем субретинального и/или интравитреального введения) индивидуума (например, человека) эффективного количества рекомбинантных вирусных частиц, содержащих одну или несколько аминокислотных замен в одном или нескольких положениях, в которых происходит взаимодействие с гепарансульфатсодержащим протеогликаном. В некоторых вариантах осуществления доза вирусных частиц, вводимых индивидууму, имеет по меньшей мере любое значение из от приблизительно 1×10^8 до приблизительно 1×10^{13} копий генома/кг веса тела. В некоторых вариантах осуществления доза вирусных частиц, вводимых индивидууму, имеет любое значение из от приблизительно 1×10^8 до приблизительно 1×10^{13} копий генома/кг веса тела.

Во время инъекции игла может быть вставлена перпендикулярно склере и направлена в центр глаза. Игла может быть вставлена таким образом, чтобы кончик заканчивался в стекловидном теле, а не в субретинальном пространстве. Можно применять любой подходящий объем для инъекции, известный из уровня техники. После инъекции глаз можно обработать стерилизующим средством, таким как антибиотик. Глаз также можно промыть для удаления избытка стерилизующего средства.

Структура сетчатки и способы определения эффективности доставки гAAV.

Известно, что сетчатка состоит из нескольких слоев. Слои клеток сетчатки могут включать внутреннюю пограничную мембрану, слой нервных волокон, слой ганглионарных клеток, внутренний сплетениевидный слой, внутренний ядерный слой, внешний сплетениевидный слой, внешний ядерный слой, внешнюю пограничную мембрану, фоторецепторный слой и слой пигментного эпителия сетчатки. Наиболее близко расположенным к стекловидному телу слоем является внутренняя пограничная мембрана. Этот слой может содержать клетки Мюллера, класс глиальных клеток. Слой нервных волокон может содержать аксоны ганглионарных клеток, которые образуют зрительный нерв. Слой ганглионарных клеток может содержать ганглионарные клетки и амакриновые клетки. Внутренний сплетениевидный слой может содержать синапсы между дендритами ганглионарных и амакриновых клеток и аксонами биполярных клеток. Внутренний ядерный слой может содержать клеточные ядра амакриновых, биполярных и горизонтальных клеток. Внешний сплетениевидный слой может содержать синапсы между дендритами горизонтальных клеток и отростками фоторецепторных клеток. Внешний ядерный слой может содержать тела фоторецепторных клеток. Внешняя или наружная пограничная мембрана может содержать межклеточные соединения, такие как адгезионные контакты и десмосомы, между апикальными дендритами клеток Мюллера, а также между этими выростами и внутренними сегментами фоторецепторных клеток. Фоторецепторный слой, также известный как слой палочек и колбочек и мембрана Джеккоба, может содержать фоторецепторные клетки, включающие палочки и колбочки. Наиболее удаленным от стекловидного тела слоем сетчатки является пигментный эпителий сетчатки (RPE), который может содержать слой гексагональных эпителиальных клеток, содержащих пигментные гранулы.

Также известно, что сетчатка содержит много различных типов клеток. Нейроны сетчатки могут включать фоторецепторные клетки, биполярные клетки, ганглионарные клетки, амакриновые клетки и горизонтальные клетки. Фоторецепторные клетки чувствительны к свету. Они могут воспринимать свет и отвечать путем передачи сигналов в зрительный нерв через биполярные клетки и ганглионарные клетки. Фоторецепторные клетки могут включать палочковые клетки, которые обычно воспринимают свет в условиях тусклого освещения, и колбочковые клетки, которые обычно воспринимают цвет и характеризуются светоощущением более яркого света. Биполярные клетки могут получать входные сигналы от фоторецепторных клеток и передавать их по синапсам к амакриновым или ганглионарным клеткам. Ганглионарные клетки могут получать информацию от амакриновых клеток или горизонтальных клеток, и их аксоны образуют зрительный нерв. Горизонтальные клетки могут интегрировать входные сигналы от нескольких фоторецепторов и содействовать приспособлению к уровням света. Амакриновые клетки представляют собой вставочные нейроны, которые способствуют регуляции активности биполярных клеток и передают входные сигналы в ганглионарные клетки. Глиальные клетки сетчатки могут включать клетки Мюллера, астроглии и микроглии.

Эффективность доставки гAAV путем субретинальной или интравитреальной инъекции можно контролировать по нескольким критериям, описанным в данном документе. Например, после лечения субъекта с применением способов по настоящему изобретению у субъекта можно оценивать, например, улучшение, и/или стабилизацию, и/или задержку прогрессирования одного или нескольких признаков или симптомов болезненного состояния по одному или нескольким клиническим параметрам, включающим описанные в данном документе. Примеры таких тестов известны из уровня техники и включают объективные, а также субъективные (например, сообщаемые субъектами) показатели. Например, для

измерения эффективности лечения в отношении зрительной функции субъекта можно оценивать одно или несколько из следующего: субъективное качество зрения или улучшенная функция центрального зрения субъекта (например, по улучшению способности субъекта к свободному чтению и узнаванию лиц), визуальная подвижность субъекта (например, по уменьшению времени, необходимого для прохождения лабиринта), острота зрения (например, по улучшению количественного показателя субъекта по LogMAR), показатели микропериметрии (например, по улучшению количественного показателя субъекта в dB), показатели периметрии глаза, адаптированного к темноте (например, по улучшению количественного показателя субъекта в dB), показатели тонкого матричного картирования (например, по улучшению количественного показателя субъекта в dB), показатели периметрии по Гольдману (например, по уменьшению размера зоны скотомы (т.е. зон слепоты) и улучшению способности к различению более мелких целей), показатели чувствительности к мельканиям (например, по улучшению в герцах), аутофлуоресценции и электрофизиологических показателей (например, по улучшению ERG). В некоторых вариантах осуществления зрительную функцию измеряют по визуальной подвижности субъекта. В некоторых вариантах осуществления зрительную функцию измеряют по остроте зрения субъекта. В некоторых вариантах осуществления зрительную функцию измеряют с помощью микропериметрии. В некоторых вариантах осуществления зрительную функцию измеряют с помощью периметрии глаза, адаптированного к темноте. В некоторых вариантах осуществления зрительную функцию измеряют с помощью ERG. В некоторых вариантах осуществления зрительную функцию измеряют по субъективному качеству зрения субъекта.

В случае заболеваний, приводящих к прогрессирующей дегенерации зрительной функции, лечение субъекта в раннем возрасте может не только приводить к замедлению или остановке прогрессирования заболевания, но также может уменьшать интенсивность утраты зрительной функции вследствие приобретенной амблиопии или предупреждать ее. Амблиопия может быть двух типов. В исследованиях на отличных от человека приматах и котят, которых выдерживали в полной темноте с рождения вплоть до возраста нескольких месяцев, животные даже при последующем воздействии света имели функциональную необратимую слепоту, несмотря на наличие посылаемых сетчаткой функциональных сигналов. Эта слепота имеет место по причине остановки в развитии нейронных связей и "обучения" коры головного мозга с рождения вследствие блокирования воздействия раздражителя. Неизвестно, можно ли будет когда-либо восстановить эту функцию. В случае заболеваний по типу дегенерации сетчатки нормальная нейронная сеть зрительной коры головного мозга была изначально "обученной" или соответствовала уровню развития до момента, в который дегенерация вызывала значительную дисфункцию. Утрата зрительного раздражителя вызывает "приобретенную" или "нажитую" дисфункцию ("приобретенную амблиопию") в том, что касается передачи сигналов в дисфункциональном глазу, что приводит к неспособности головного мозга к интерпретации сигналов или к "использованию" этого глаза. В этих случаях "приобретенной амблиопии" неизвестно, может ли улучшение передачи сигналов от сетчатки в результате генной терапии амблиопичного глаза когда-либо привести к приобретению более нормальной функции в дополнение к замедлению прогрессирования или стабилизации болезненного состояния. В некоторых вариантах осуществления человек, подвергаемый лечению, имеет возраст менее 30 лет. В некоторых вариантах осуществления человек, подвергаемый лечению, имеет возраст менее 20 лет. В некоторых вариантах осуществления человек, подвергаемый лечению, имеет возраст менее 18 лет. В некоторых вариантах осуществления человек, подвергаемый лечению, имеет возраст менее 15 лет. В некоторых вариантах осуществления человек, подвергаемый лечению, имеет возраст менее 14 лет. В некоторых вариантах осуществления человек, подвергаемый лечению, имеет возраст менее 13 лет. В некоторых вариантах осуществления человек, подвергаемый лечению, имеет возраст менее 12 лет. В некоторых вариантах осуществления человек, подвергаемый лечению, имеет возраст менее 10 лет. В некоторых вариантах осуществления человек, подвергаемый лечению, имеет возраст менее 8 лет. В некоторых вариантах осуществления человек, подвергаемый лечению, имеет возраст менее 6 лет.

При некоторых глазных нарушениях имеют место феномены "клеток-нянь", при которых улучшение функции одного типа клеток приводит к улучшению функции другого. Например, трансдукция RPE центральной зоны сетчатки, опосредованная gAAV по настоящему изобретению, может в таком случае улучшать функцию палочек, и, в свою очередь, улучшение функции палочек приводит к улучшению функции колбочек. Соответственно, лечение в отношении одного типа клеток может приводить к улучшению функции другого.

Выбор конкретного вектора и композиции на основе gAAV зависит от ряда различных факторов, включающих, без ограничения, индивидуальный анамнез человека и характерные особенности состояния и индивидуума, подвергаемых лечению. Оценка таких характерных особенностей и разработка соответствующего режима терапии в конечном счете является ответственностью лечащего врача.

В некоторых вариантах осуществления у человека, подлежащего лечению, имеется генетическое глазное нарушение, но еще не проявляются клинические признаки или симптомы. В некоторых вариантах осуществления у человека, подлежащего лечению, имеется глазное нарушение. В некоторых вариантах осуществления у человека, подлежащего лечению, проявляются один или несколько признаков или симптомов глазного нарушения.

Неограничивающие примеры глазных нарушений, которые можно лечить с помощью систем и способов по настоящему изобретению, включают аутосомно-рецессивную тяжелую дегенерацию сетчатки с ранним началом (врожденный амавроз Лебера), врожденную ахроматопию, болезнь Штаргардта, болезнь Беста, болезнь Дойна, колбочковую дистрофию, пигментную дистрофию сетчатки, X-сцепленный ретиношизис, синдром Ашера, возрастную макулярную дегенерацию, атрофическую форму возрастной макулярной дегенерации, неоваскулярную форму AMD, диабетическую макулопатию, пролиферативную диабетическую ретинопатию (PDR), кистозный макулярный отек, центральную серозную ретинопатию, отслоение сетчатки, внутриглазное воспаление, глаукому, задний увеит, хороидермию и наследственную оптическую нейропатию Лебера.

Композиции по настоящему изобретению (например, частицы вируса AAV для субретинальной или интравитреальной доставки, содержащие капсид AAV с одной или несколькими заменами аминокислот, которые взаимодействуют с HSPG или находятся в одном или нескольких положениях, соответствующих аминокислотам 484, 487, 532, 585 или 588) можно применять в отдельности либо в комбинации с одним или несколькими дополнительными терапевтическими средствами для лечения глазных нарушений. Интервал между последовательными введениями может измеряться в сроках по меньшей мере (или, в качестве альтернативы, менее чем) минут, часов или дней.

В некоторых вариантах осуществления в субретинальное пространство или стекловидное тело можно вводить одно или несколько дополнительных терапевтических средств (например, посредством интравитреального введения). Неограничивающие примеры дополнительных терапевтических средств включают полипептидные нейротрофические факторы (например, GDNF, CNTF, BDNF, FGF2, PEDF, EPO), полипептидные антиангиогенные факторы (например, sFlt, ангиостатин, эндостатин), антиангиогенные нуклеиновые кислоты (например, siRNA, miRNA, рибозим), например, антиангиогенные нуклеиновые кислоты, направленные против VEGF, антиангиогенные морфолиновые олигонуклеотиды, например, антиангиогенные морфолиновые олигонуклеотиды, направленные против VEGF, антиангиогенные антитела и/или фрагменты антител (например, Fab-фрагменты), например, антиангиогенные антитела и/или фрагменты антител, направленные против VEGF.

Способы доставки в CNS.

В некоторых вариантах осуществления посредством введения эффективного количества рекомбинантных вирусных частиц (например, частиц AAV2, AAVrh8R и т.д.), содержащих одну или несколько аминокислотных замен в одном или нескольких положениях, в которых происходит взаимодействие с гепарансульфатсодержащим протеогликаном, по настоящему раскрытию осуществляют трансдукцию нейронов (например, стриарных нейронов, таких как шипиковые нейроны) в месте введения или около него. В некоторых вариантах осуществления показатель трансдукции нейронов превышает приблизительно любое значение из 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 или 100%. В некоторых вариантах осуществления от приблизительно 5% до приблизительно 100%, от приблизительно 10% до приблизительно 50%, от приблизительно 10% до приблизительно 30%, от приблизительно 25% до приблизительно 75%, от приблизительно 25% до приблизительно 50% или от приблизительно 30% до приблизительно 50% нейронов являются трансдуцированными. Способы идентификации нейронов, трансдуцированных рекомбинантными вирусными частицами, экспрессирующими гетерологичную нуклеиновую кислоту, известны из уровня техники; например, для выявления экспрессии можно применять иммуногистохимический анализ, выявление РНК (например, qPCR, нозерн-блоттинг, секвенирование РНК, гибридизацию *in situ* и т.п.) или применение совместно экспрессируемого маркера, такого как усиленный зеленый флуоресцентный белок.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения способы включают введение в головной мозг млекопитающего эффективного количества рекомбинантных вирусных частиц, содержащих одну или несколько аминокислотных замен в одном или нескольких положениях, в которых происходит взаимодействие с гепарансульфатсодержащим протеогликаном, по настоящему раскрытию для лечения млекопитающего, например, человека. В некоторых вариантах осуществления композицию вводят путем инъекции в одно или несколько местоположений в головном мозге для обеспечения экспрессии гетерологичной нуклеиновой кислоты по настоящему раскрытию по меньшей мере в нейронах. В некоторых вариантах осуществления композицию вводят путем инъекции в любое из одного, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти, десяти или более десяти местоположений в головном мозге. В некоторых вариантах осуществления композицию вводят путем инъекции в полосатое тело. В некоторых вариантах осуществления композицию вводят путем инъекции в дорсальную часть полосатого тела. В некоторых вариантах осуществления композицию вводят путем инъекции в скорлупу чечевицеобразного ядра. В некоторых вариантах осуществления композицию вводят путем инъекции в хвостатое ядро. В некоторых вариантах осуществления композицию вводят путем инъекции в скорлупу чечевицеобразного ядра и в хвостатое ядро. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные вирусные частицы, содержащие одну или несколько аминокислотных замен в одном или нескольких положениях, в которых происходит взаимодействие с гепарансульфатсодержащим протеогликаном, вводят в CNS индивидуума путем стереотаксической инъекции, например, в полосатое тело. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные вирусные частицы, содержащие одну или несколько аминокислотных замен в одном

или нескольких положениях, в которых происходит взаимодействие с гепарансульфатсодержащим протеогликаном, вводят в CNS индивидуума путем конвекционной доставки (CED), например, CED в полосатое тело.

Введение частиц гAAV можно проводить многими путями. В некоторых вариантах осуществления введение включает прямую спинномозговую инъекцию и/или интрацеребральное введение. В некоторых вариантах осуществления введение производят в участок, выбранный из большого мозга, продолговатого мозга, варолиева моста, мозжечка, полости черепа, оболочек, окружающих головной мозг, твердой мозговой оболочки, паутинной мозговой оболочки, мягкой мозговой оболочки, цереброспинальной жидкости (CSF) субарахноидального пространства, окружающего головной мозг, глубоких мозжечковых ядер мозжечка, желудочковой системы большого мозга, субарахноидального пространства, полосатого тела, коры головного мозга, перегородки, таламуса, гипоталамуса и паренхимы головного мозга. В некоторых вариантах осуществления введение включает интрацеребровентрикулярную инъекцию по меньшей мере в один боковой желудочек головного мозга. В некоторых вариантах осуществления введение включает интратекальную инъекцию в шейную, грудную и/или поясничную область. В некоторых вариантах осуществления введение включает интрастриарную инъекцию. В некоторых вариантах осуществления введение включает внутриталамическую инъекцию. В данном документе описаны различные методики и устройства, подходящие для этих путей введения, например, CED и/или стереотаксическая инъекция.

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные вирусные частицы, содержащие одну или несколько аминокислотных замен в одном или нескольких положениях, в которых происходит взаимодействие с гепарансульфатсодержащим протеогликаном, вводят в одно полушарие головного мозга. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные вирусные частицы вводят в оба полушария головного мозга.

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные вирусные частицы, содержащие одну или несколько аминокислотных замен в одном или нескольких положениях, в которых происходит взаимодействие с гепарансульфатсодержащим протеогликаном, вводят в несколько местоположений одновременно или последовательно. В некоторых вариантах осуществления многократные инъекции рекомбинантных вирусных частиц проводят с интервалом не более чем в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 12 или 24 ч.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает способ лечения человека с нарушением со стороны CNS путем введения эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей рекомбинантные вирусные частицы, содержащие одну или несколько аминокислотных замен в одном или нескольких положениях, в которых происходит взаимодействие с гепарансульфатсодержащим протеогликаном, по настоящему раскрытию для лечения нарушения со стороны CNS. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ.

Как правило, можно доставлять от приблизительно 1 мкл до приблизительно 1 мл композиции по настоящему изобретению (например, от приблизительно 100 мкл до приблизительно 500 мкл композиции). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения объем рекомбинантных вирусных частиц, содержащих одну или несколько аминокислотных замен в одном или нескольких положениях, в которых происходит взаимодействие с гепарансульфатсодержащим протеогликаном, вводимых путем инъекции в полосатое тело, составляет приблизительно или превышает приблизительно любое количество из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 мкл или 1 мл или любую величину между ними.

В некоторых вариантах осуществления первый объем рекомбинантных вирусных частиц, содержащих одну или несколько аминокислотных замен в одном или нескольких положениях, в которых происходит взаимодействие с гепарансульфатсодержащим протеогликаном, вводят путем инъекции в первую область головного мозга, а второй объем вариантов частиц гAAV вводят путем инъекции во вторую область головного мозга. Например, в некоторых вариантах осуществления первый объем вариантов частиц гAAV вводят путем инъекции в хвостатое ядро, а второй объем композиции вводят путем инъекции в скорлупу чечевицеобразного ядра. В некоторых вариантах осуществления 1X объем вариантов частиц гAAV вводят путем инъекции в хвостатое ядро, и 1,5X, 2X, 2,5X, 3X, 3,5X или 4X объем вариантов частиц гAAV вводят путем инъекции в скорлупу чечевицеобразного ядра, где X представляет собой объем, который составляет приблизительно или превышает приблизительно любое количество из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 мкл или 1 мл или любую величину между ними.

Композиции по настоящему изобретению (например, рекомбинантные вирусные частицы, содержащие одну или несколько аминокислотных замен в одном или нескольких положениях, в которых происходит взаимодействие с гепарансульфатсодержащим протеогликаном по настоящему раскрытию) можно применять в отдельности либо в комбинации с одним или несколькими дополнительными терапевтическими средствами для лечения нарушения со стороны CNS (например, HD). Интервал между последовательными введениями может измеряться в сроках по меньшей мере (или, в качестве альтернативы, менее чем) минут, часов или дней.

В некоторых вариантах осуществления способы включают введение в CNS эффективного количе-

ства рекомбинантных вирусных частиц, содержащих одну или несколько аминокислотных замен в одном или нескольких положениях, в которых происходит взаимодействие с гепарансульфатсодержащим протеогликаном, содержащих вектор, кодирующий гетерологичную нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления вирусный титр в композиции имеет по меньшей мере приблизительно любое значение из 5×10^{12} , 6×10^{12} , 7×10^{12} , 8×10^{12} , 9×10^{12} , 10×10^{12} , 11×10^{12} , 15×10^{12} , 20×10^{12} , 25×10^{12} , 30×10^{12} или 50×10^{12} копий генома/мл. В некоторых вариантах осуществления вирусный титр в композиции имеет приблизительно любое значение из от 5×10^{12} до 6×10^{12} , от 6×10^{12} до 7×10^{12} , от 7×10^{12} до 8×10^{12} , от 8×10^{12} до 9×10^{12} , от 9×10^{12} до 10×10^{12} , от 10×10^{12} до 11×10^{12} , от 11×10^{12} до 15×10^{12} , от 15×10^{12} до 20×10^{12} , от 20×10^{12} до 25×10^{12} , от 25×10^{12} до 30×10^{12} , от 30×10^{12} до 50×10^{12} или от 50×10^{12} до 100×10^{12} копий генома/мл. В некоторых вариантах осуществления вирусный титр в композиции имеет приблизительно любое значение из от 5×10^{12} до 10×10^{12} , от 10×10^{12} до 25×10^{12} или от 25×10^{12} до 50×10^{12} копий генома/мл. В некоторых вариантах осуществления вирусный титр в композиции имеет по меньшей мере приблизительно любое значение из 5×10^9 , 6×10^9 , 7×10^9 , 8×10^9 , 9×10^9 , 10×10^9 , 11×10^9 , 15×10^9 , 20×10^9 , 25×10^9 , 30×10^9 или 50×10^9 трансдуцирующих единиц/мл. В некоторых вариантах осуществления вирусный титр в композиции имеет приблизительно любое значение из от 5×10^9 до 6×10^9 , от 6×10^9 до 7×10^9 , от 7×10^9 до 8×10^9 , от 8×10^9 до 9×10^9 , от 9×10^9 до 10×10^9 , от 10×10^9 до 11×10^9 , от 11×10^9 до 15×10^9 , от 15×10^9 до 20×10^9 , от 20×10^9 до 25×10^9 , от 25×10^9 до 30×10^9 , от 30×10^9 до 50×10^9 или от 50×10^9 до 100×10^9 трансдуцирующих единиц/мл. В некоторых вариантах осуществления вирусный титр в композиции имеет приблизительно любое значение из от 5×10^9 до 10×10^9 , от 10×10^9 до 15×10^9 , от 15×10^9 до 25×10^9 или от 25×10^9 до 50×10^9 трансдуцирующих единиц/мл. В некоторых вариантах осуществления вирусный титр в композиции имеет по меньшей мере приблизительно любое значение из 5×10^{10} , 6×10^{10} , 7×10^{10} , 8×10^{10} , 9×10^{10} , 10×10^{10} , 11×10^{10} , 15×10^{10} , 20×10^{10} , 25×10^{10} , 30×10^{10} , 40×10^{10} или 50×10^{10} инфекционных единиц/мл. В некоторых вариантах осуществления вирусный титр в композиции имеет по меньшей мере приблизительно любое значение из от 5×10^{10} до 6×10^{10} , от 6×10^{10} до 7×10^{10} , от 7×10^{10} до 8×10^{10} , от 8×10^{10} до 9×10^{10} , от 9×10^{10} до 10×10^{10} , от 10×10^{10} до 11×10^{10} , от 11×10^{10} до 15×10^{10} , от 15×10^{10} до 20×10^{10} , от 20×10^{10} до 25×10^{10} , от 25×10^{10} до 30×10^{10} , от 30×10^{10} до 40×10^{10} , от 40×10^{10} до 50×10^{10} или от 50×10^{10} до 100×10^{10} инфекционных единиц/мл. В некоторых вариантах осуществления вирусный титр в композиции имеет по меньшей мере приблизительно любое значение из от 5×10^{10} до 10×10^{10} , от 10×10^{10} до 15×10^{10} , от 15×10^{10} до 25×10^{10} или от 25×10^{10} до 50×10^{10} инфекционных единиц/мл.

В некоторых вариантах осуществления способы включают введение в CNS индивидуума (например, человека) эффективного количества рекомбинантных вирусных частиц, содержащих одну или несколько аминокислотных замен в одном или нескольких положениях, в которых происходит взаимодействие с гепарансульфатсодержащим протеогликаном. В некоторых вариантах осуществления доза вирусных частиц, вводимых индивидууму, имеет по меньшей мере любое значение из от приблизительно 1×10^8 до приблизительно 1×10^{13} копий генома/кг веса тела. В некоторых вариантах осуществления доза вирусных частиц, вводимых индивидууму, имеет любое значение от приблизительно 1×10^8 до приблизительно 1×10^{13} копий генома/кг веса тела.

В некоторых вариантах осуществления способы включают введение в CNS индивидуума (например, человека) эффективного количества рекомбинантных вирусных частиц, содержащих одну или несколько аминокислотных замен в одном или нескольких положениях, в которых происходит взаимодействие с гепарансульфатсодержащим протеогликаном, для индивидуума. В некоторых вариантах осуществления общее количество вирусных частиц, вводимых индивидууму, имеет по меньшей мере любое значение из от приблизительно 1×10^9 до приблизительно 1×10^{14} копий генома. В некоторых вариантах осуществления общее количество вирусных частиц, вводимых индивидууму, имеет любое значение из от приблизительно 1×10^9 до приблизительно 1×10^{14} копий генома.

V. Экспрессионные конструкции.

В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает способы доставки гетерологичной нуклеиновой кислоты в глаз путем субретинальной доставки вектора на основе гAAV, содержащего гетерологичную нуклеиновую кислоту, и где вектор на основе гAAV инкапсидирован в капсид гAAV (например, капсид гAAV2, капсид гAAVrh8R и т.д.), содержащий одну или несколько замен аминокислот, которые взаимодействуют с HSPG. В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает способы лечения нарушения со стороны CNS у индивидуума, включающие доставку композиции, содержащей частицы гAAV, в CNS индивидуума, где частицы гAAV содержат (а) капсид гAAV, содержащий капсидный белок гAAV, содержащий одну или несколько аминокислотных замен в одном или нескольких положениях, в которых происходит взаимодействие с гепарансульфатсодержащим протеогликаном, и (b) вектор на основе гAAV, содержащий гетерологичную нуклеиновую кислоту и по меньшей мере один концевой повтор AAV. В некоторых вариантах осуществления гетерологичная нуклеиновая кислота (например, трансген) функционально связана с промотором. Иллюстративные промоторы включают, без ограничения, немедленно-ранний промотор цитомегаловируса (CMV), LTR RSV, LTR MoMLV, промотор фосфоглицераткиназы-1 (PGK), промотор вируса обезьян 40 (SV40) и промотор СК6, промотор транскрипцина (TTR), промотор ТК, тетрациклин-чувствительный промотор (TRE), промотор HBV, промотор hAAT, LSP-промотор, химерные печень-специфичные промоторы (LSP), промотор E2F, промотор

теломеразы (hTERT); промотор энхансер цитомегаловируса/промотор бета-актина курицы/промотор β -глобина кролика (промотор CAG; Niwa et al., Gene, 1991, 108(2):193-9) и промотор фактора элонгации 1-альфа (EF1-альфа) (Kim et al., Gene, 1990, 91(2):217-23 и Guo et al., Gene Ther., 1996, 3(9):802-10). В некоторых вариантах осуществления промотор включает в себя промотор β -глюкуронидазы человека или энхансер цитомегаловируса, соединенный с промотором β -актина курицы (CBA). Промотор может представлять собой конститутивный, индуцируемый или репрессируемый промотор. В некоторых вариантах осуществления промотор способен обеспечивать экспрессию гетерологичной нуклеиновой кислоты в клетке глаза. В некоторых вариантах осуществления промотор способен обеспечивать экспрессию гетерологичной нуклеиновой кислоты в фоторецепторных клетках или RPE. В вариантах осуществления промотор представляет собой промотор родопсинкиназы (RK); например, промотор RK человека. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой промотор опсина; например, промотор опсина человека или промотор опсина мыши.

Настоящее изобретение предполагает применение рекомбинантного вирусного генома для введения одной или нескольких последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих терапевтические полипептиды и/или нуклеиновую кислоту, для упаковки в вирусную частицу gAAV, содержащую одну или несколько замен аминокислот, которые взаимодействуют с HSPG. Рекомбинантный вирусный геном может содержать любой элемент для осуществления экспрессии терапевтического полипептида и/или нуклеиновой кислоты, например, промотор, ITR, элемент связывания рибосомы, терминатор, энхансер, селективный маркер, интрон, сигнал поли-А и/или точку начала репликации.

В некоторых вариантах осуществления вектор на основе gAAV представляет собой самокомплементарный вектор на основе gAAV, например, вектор, содержащий рекомбинантный самовзаимодополняющий (выражение "самокомплементарный" может использоваться в данном документе взаимозаменяемо) геном. Вирусные частицы AAV с самовзаимодополняющими геномами и способы применения самовзаимодополняющих геномов AAV описаны в патентах США № 6596535; 7125717; 7465583; 7785888; 7790154; 7846729; 8093054 и 8361457; а также в Wang Z., et al. (2003) Gene Ther 10:2105-2111, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. gAAV, содержащий самовзаимодополняющий геном, будет быстро образовывать двухцепочечную молекулу ДНК благодаря своим частично комплементарным последовательностям (например, комплементарным кодирующим и некодирующим цепям трансгена). В некоторых вариантах осуществления вектор содержит первую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую гетерологичную нуклеиновую кислоту, и вторую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую комплементарную последовательность нуклеиновой кислоты, где первая последовательность нуклеиновой кислоты может образовывать внутрицепочечные пары оснований со второй последовательностью нуклеиновой кислоты вдоль большей части или всей ее длины.

В некоторых вариантах осуществления первая гетерологичная последовательность нуклеиновой кислоты и вторая гетерологичная последовательность нуклеиновой кислоты соединены с помощью мутантного ITR (например, правого ITR). В некоторых вариантах осуществления ITR содержит полинуклеотидную последовательность 5'-CACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGCGACCAAAGGTCGCCCCACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCG-3' (SEQ ID NO: 8). Мутантный ITR характеризуется делецией D-области, содержащей последовательность концевой разрешения. В результате, при репликации вирусного генома AAV белки гер не отщепляют вирусный геном на мутированном ITR, и как таковой, рекомбинантный вирусный геном, содержащий следующее в порядке от 5' к 3', будет упакован в вирусный капсид: ITR AAV, первая гетерологичная полинуклеотидная последовательность, в том числе регуляторные последовательности, мутированный ITR AAV, второй гетерологичный полинуклеотид в обратной ориентации по отношению к первому гетерологичному полинуклеотиду и третий ITR AAV.

VI. Вирусные частицы и способы получения вирусных частиц.

Вирусные частицы gAAV.

В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает способы доставки гетерологичной нуклеиновой кислоты в глаз путем субретинальной доставки вектора на основе gAAV, содержащего гетерологичную нуклеиновую кислоту, и где вектор на основе gAAV инкапсидирован в капсид gAAV (например, gAAV2, gAAVrh8R и т.д.), содержащий одну или несколько замен аминокислот, которые взаимодействуют с HSPG. В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает способы и наборы, относящиеся к доставке частиц gAAV в CNS индивидуума.

В некоторых вариантах осуществления частица gAAV содержит вектор на основе gAAV. В некоторых вариантах осуществления вирусная частица представляет собой рекомбинантную частицу AAV, содержащую нуклеиновую кислоту, содержащую гетерологичный трансген, фланкированный одним или двумя инвертированными концевыми повторами (ITR) AAV. Нуклеиновая кислота инкапсидирована в частице AAV. Частица AAV также содержит капсидные белки. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержит представляющую(представляющие) интерес кодирующую(кодирующие) последовательность(последовательности) (например, гетерологичный трансген), функционально связанные компоненты в направлении транскрипции, контролирующие последовательности, в том числе последовательности инициации и терминации, с образованием, таким образом, кассеты экспрессии.

Кассета экспрессии фланкирована на 5'- и 3'-конце по меньшей мере одной функциональной последовательностью ITR AAV. Под "функциональными последовательностями ITR AAV" подразумевается, что последовательности ITR функционируют в качестве предполагаемых для спасения, репликации и упаковки вириона AAV. См. Davidson et al., PNAS, 2000, 97(7):3428-32; Passini et al., J. Virol., 2003, 77(12):7034-40; и Pechan et al., Gene Ther., 2009, 16:10-16, все из которых включены в данный документ во всей своей полноте посредством ссылки. Для практического использования некоторых аспектов настоящего изобретения рекомбинантные векторы содержат по меньшей мере все из последовательностей AAV, необходимые для капсидирования и физических структур для инфицирования гAAV. ITR AAV для использования в векторах по настоящему изобретению не требуют наличия нуклеотидной последовательности дикого типа (например, как описано у Kotin, Hum. Gene Ther., 1994, 5:793-801) и могут быть изменены посредством вставки, делеции или замены нуклеотидов, или ITR AAV могут происходить из любого из нескольких серотипов AAV. В настоящее время известно более 40 серотипов AAV, и продолжают идентифицироваться новые серотипы и варианты существующих серотипов. См. Gao et al., PNAS, 2002, 99(18): 11854-6; Gao et al., PNAS, 2003, 100(10):6081-6; и Bossis et al., J. Virol., 2003, 77(12):6799-810.

Использование любого серотипа AAV рассматривается в пределах объема настоящего изобретения. В некоторых вариантах осуществления вектор на основе гAAV представляет собой вектор, полученный из серотипа AAV, содержащий, без ограничения, ITR AAV, которые представляют собой ITR AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471 A, AAV DJ, AAV коз, AAV крупного рогатого скота или AAV мышей и т.п. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота в AAV содержит ITR из ITR AAV, который представляет собой AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, AAV коз, AAV крупного рогатого скота или AAV мышей и т.п. В определенных вариантах осуществления нуклеиновая кислота в AAV содержит ITR AAV2. Как описано выше, частицы гAAV могут дополнительно содержать капсид, содержащий капсидные белки гAAV, содержащие одну или несколько аминокислотных замен в одном или нескольких положениях, в которых происходит взаимодействие с гепарансульфатсодержащим протеогликаном.

В некоторых вариантах осуществления вектор может содержать "лишнюю" нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления "лишняя" нуклеиновая кислота может кодировать зеленый флуоресцентный белок. В некоторых вариантах осуществления "лишняя" нуклеиновая кислота может быть расположена между промотором и нуклеиновой кислотой, кодирующей средство для RNAi.

Для оптимизации трансдукции конкретных клеток-мишеней или для нацеливания на определенные типы клеток в пределах конкретной ткани-мишени (например, ткани CNS) применяют различные серотипы AAV. Частица гAAV может содержать вирусные белки и вирусные нуклеиновые кислоты такого же серотипа или смешанного серотипа. Например, в некоторых вариантах осуществления частица гAAV может содержать капсидные белки AAV2 по настоящему изобретению и по меньшей мере один ITR AAV2, или она может содержать капсидные белки AAV2 и по меньшей мере один ITR AAV1. В данном документе представлена любая комбинация серотипов AAV для получения частицы гAAV, как если бы каждая комбинация была в явной форме описана в данном документе. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает частицы гAAV, содержащие капсид AAV2 по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает частицы гAAV, содержащие капсид AAVrh8R по настоящему изобретению.

Получение частиц AAV.

Из уровня техники известны многочисленные способы производства векторов на основе гAAV, включающие трансфекцию, получение стабильных линий клеток и применение систем для производства инфекционных гибридных вирусов, которые включают гибриды аденовирус-AAV, гибриды герпес-вирус-AAV (Conway, JE et al. (1997) J. Virology 71(11):8780-8789) и гибриды бакуловирус-AAV. Для всех культур для производства гAAV для производства частиц вируса гAAV требуются: 1) подходящие клетки-хозяева, включающие, например, линии клеток, полученные от человека, такие как клетки HeLa, A549 или 293, или линии клеток, полученные от насекомых, такие как SF-9, в случае систем для производства бакуловирусов; 2) подходящая вспомогательная функция вируса, обеспечиваемая аденовирусом дикого типа или мутантным аденовирусом (таким как термочувствительный аденовирус), вирусом герпеса, бакуловирусом или плазмидной конструкцией, обеспечивающей вспомогательные функции; 3) гены и продукты генов гер и сар AAV; 4) трансген (такой как терапевтический трансген), фланкированный по меньшей мере одной последовательностью ITR AAV; и 5) подходящие среды и компоненты сред для поддержания производства гAAV. Для производства векторов на основе гAAV можно применять подходящие среды, известные из уровня техники. Эти среды включают, без ограничения, среды, производимые Nuclone Laboratories и JRH, в том числе модифицированную среду Игла (MEM), среду Игла, модифицированную по Дульбекко (DMEM), изготавливаемые по заказу составы, такие как описанные в патенте США № 6566118, и среду Sf-900 II SFM, описанную в патенте США № 6723551, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте, в особенности в отношении

изготавливаемых по заказу составов сред для применения в производстве рекомбинантных векторов на основе AAV.

Частицы гAAV можно получать с помощью способов, известных из уровня техники. См., например, патенты США № 6566118; 6989264 и 6995006. При практическом использовании настоящего изобретения клетки-хозяева для продукции частиц гAAV включают в себя клетки млекопитающих, клетки насекомых, растительные клетки, микроорганизмы и дрожжи. Клетки-хозяева также могут быть упаковывающими клетками, в которых гены гер и сар AAV стабильно сохраняются в клетке-хозяине или клетках-продуцентах, в которых стабильно сохраняется геном вектора AAV. Иллюстративные упаковывающие клетки и клетки-продуценты получают из клеток 293, A549 или HeLa. Векторы AAV очищают и помещают в составы с помощью стандартных методик, известных в данной области.

В некоторых вариантах осуществления частицы гAAV можно получать с помощью способа тройной трансфекции, такого как иллюстративный способ тройной трансфекции, приведенный ниже. Вкратце, плазмиду, содержащую ген гер и ген капсидного белка, вместе с аденовирусной плазмидой-помощником можно ввести путем трансфекции (например, с применением кальций-фосфатного способа) в линию клеток (например, клетки HEK-293), и вирус можно собрать и необязательно очистить.

В некоторых вариантах осуществления частицы гAAV можно получать с помощью способа с использованием линии клеток-продуцентов, такого как иллюстративный способ с использованием линии клеток-продуцентов, приведенный ниже (см. также упоминаемый в Martin et al. (2013) *Human Gene Therapy Methods* 24:253-269). Вкратце, линию клеток (например, линию клеток HeLa) можно стабильно трансфицировать плазмидой, содержащей ген гер, ген капсидного белка и последовательность промотор-трансген. Линии клеток можно подвергать скринингу для выбора лидерного клона для производства гAAV, который можно затем размножить в производственном биореакторе и инфицировать аденовирусом (например, аденовирусом дикого типа) в качестве помощника для начала производства гAAV. Вирус можно затем собрать, аденовирус можно инактивировать (например, под действием тепла) и/или удалить, а частицы гAAV можно очистить.

В некоторых аспектах предусмотрен способ получения любой частицы гAAV, раскрываемой в данном документе, включающий (а) культивирование клетки-хозяина в условиях, при которых получают частицы гAAV, где клетка-хозяин содержит (i) один или несколько генов AAV, обеспечивающих упаковку, где каждый указанный ген AAV, обеспечивающий упаковку, кодирует белок AAV, участвующий в репликации и/или инкапсидировании; (ii) провектор на основе гAAV, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую терапевтический полипептид и/или нуклеиновую кислоту, как описано в данном документе, фланкированный по меньшей мере одним ITR AAV, и (iii) вспомогательный функциональный элемент AAV; и (b) извлечение частиц гAAV, образуемых в клетке-хозяине. В некоторых вариантах осуществления указанный по меньшей мере один ITR AAV выбран из группы, состоящей из ITR AAV, который представляет собой AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAVDJ, AAV коз, AAV крупного рогатого скота или AAV мышей и т.п. В некоторых вариантах осуществления указанный белок, участвующий в инкапсидировании, содержит одну или несколько аминокислотных замен в одном или нескольких положениях, в которых происходит взаимодействие с гепарансульфатсодержащим протеогликаном. В некоторых вариантах осуществления белок, участвующий в инкапсидировании, представляет собой белок AAV2, участвующий в инкапсидировании. В некоторых вариантах осуществления белок, участвующий в инкапсидировании, представляет собой белок AAVrh8R, участвующий в инкапсидировании.

Подходящая культуральная среда для получения гAAV по настоящему изобретению может быть дополнена сывороткой или сывороточными рекомбинантными белками на уровне 0,5%-20% (об./об. или вес/об.). В качестве альтернативы, как известно из уровня техники, векторы на основе гAAV можно получать в бессывороточных условиях, которые также могут называться средой, не содержащей продуктов животного происхождения. Средний специалист в данной области может принять во внимание, что коммерческие или изготавливаемые по заказу среды, предназначенные для поддержания получения векторов на основе гAAV, также могут быть дополнены одним или несколькими компонентами культур клеток, известными из уровня техники, включающими, без ограничения, глюкозу, витамины, аминокислоты и/или факторы роста, в целях повышения титра гAAV в производственных культурах.

Культуры для получения гAAV можно выращивать в разнообразных условиях (в широком диапазоне температур, в течение различных промежутков времени и т.п.), подходящих для конкретной используемой клетки-хозяина. Как известно из уровня техники, культуры для получения гAAV включают культуры, зависимые от прикрепления, которые можно культивировать в подходящих сосудах для культур, зависимых от прикрепления, как, например, в роллерных флаконах, на половолоконных фильтрах, на микроносителях и в биореакторах с фильтрующим наполнителем или псевдооживленным слоем. Культуры для получения векторов на основе гAAV также могут включать клетки-хозяева, приспособленные к росту в суспензии, такие как клетки HeLa, 293 и SF-9, которые можно культивировать разнообразными способами, в том числе, например, во флаконах с перемешиванием, биореакторах с механическим перемешиванием и однофазовых системах, таких как резервуарная система Wave.

Частицы вектора на основе гAAV по настоящему изобретению можно собирать из культур для по-

лучения гAAV посредством лизиса клеток-хозяев в производственной культуре или посредством сбора израсходованной среды из производственной культуры, при условии, что клетки культивируют в условиях, которые, как известно из уровня техники, вызывают высвобождение частиц гAAV в среду из интактных клеток, как описано более подробно в патенте США № 6566118. Подходящие способы лизиса клеток также известны из уровня техники и включают, например, несколько циклов замораживания/размораживания, обработку ультразвуком, микрофлюидизацию и обработку химическими веществами, такими как детергенты и/или протеазы.

В дополнительном варианте осуществления частицы гAAV очищаются. Выражение "очищенный", применяемое в данном документе, включает получение частиц гAAV, лишенных, по меньшей мере, некоторых из других компонентов, которые могут также присутствовать, если частицы гAAV встречаются в природе или изначально получены из них. Таким образом, например, выделенные частицы гAAV можно получать с помощью методики очистки для обогащения ими исходной смеси, такой как лизат культуры или надосадочная жидкость производственной культуры. Обогащение можно измерять с помощью множества способов, таких как, например, по доле устойчивых к ДНКазе частиц (DRP) или геномных копий (gc), присутствующих в растворе, или по инфекционности, либо его можно измерить по отношению ко второму, потенциально мешающему веществу, присутствующему в исходной смеси, такому как контаминанты, в том числе контаминанты производственной культуры или внутрипроизводственные контаминанты, в том числе хелперный вирус, компоненты среды и т.п.

В некоторых вариантах осуществления урожай культуры для получения гAAV осветляют для удаления дебриса клеток-хозяев. В некоторых вариантах осуществления урожай производственной культуры осветляют путем фильтрации через ряд глубинных фильтров, включающих, например, модульный фильтр Millipore Millistak+HC марки D0HC, модульный фильтр Millipore Millistak+HC марки A1HC и фильтр Opticap XL10 с гидрофильной мембраной фильтра Millipore Express SHC на 0,2 мкм. Осветление также можно осуществлять с помощью ряда других стандартных методик, известных из уровня техники, таких как центрифугирование или фильтрация через любой фильтр из ацетата целлюлозы с размером пор 0,2 мкм или более, известный из уровня техники.

В некоторых вариантах осуществления урожай культуры для получения гAAV дополнительно обрабатывают с помощью Benzonase® для расщепления любой высокомолекулярной ДНК, присутствующей в производственной культуре. В некоторых вариантах осуществления расщепление с помощью Benzonase® осуществляют в стандартных условиях, известных из уровня техники, включающих, например, конечную концентрацию Benzonase® 1-2,5 единиц/мл при температуре, варьирующей в диапазоне от окружающей до 37°C, в течение периода от 30 минут до нескольких часов.

Частицы гAAV можно выделять или очищать с применением одной или нескольких следующих стадий очистки: равновесного центрифугирования; проточной анионообменной фильтрации; тангенциальной поточной фильтрации (TFF) для концентрирования частиц гAAV; захвата гAAV посредством хроматографии на апатите; термоинактивации вируса-помощника; захвата гAAV посредством хроматографии гидрофобных взаимодействий; замены буфера посредством эксклюзионной хроматографии (SEC); нанофильтрации и захвата гAAV посредством анионообменной хроматографии, катионообменной хроматографии или аффинной хроматографии. Эти стадии можно применять в отдельности, в различных комбинациях или в разном порядке. В некоторых вариантах осуществления способ включает все стадии в порядке, описанном ниже. Способы очистки частиц гAAV находятся, например, в Xiao et al. (1998) *Journal of Virology* 72:2224-2232; патентах США № 6989264 и 8137948; а также WO 2010/148143.

В данном документе также предусматриваются фармацевтические композиции, содержащие частицу гAAV, содержащую гетерологичную нуклеиновую кислоту, кодирующую терапевтический полипептид и/или терапевтическую нуклеиновую кислоту, где частица гAAV содержит капсид гAAV, содержащий одну или несколько замен аминокислот, которые взаимодействуют с HSPG, и фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтические композиции могут подходить для любого способа введения, описанного в данном документе; например, для субретинального введения.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции, содержащие гAAV, описанный в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель, пригодны для введения человеку. Такие носители хорошо известны из уровня техники (см., например, Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th Edition, pp. 1035-1038 и 1570-1580). В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции, содержащие гAAV, описанный в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель, пригодны для глазной инъекции. Такими фармацевтически приемлемыми носителями могут быть стерильные жидкости, такие как вода и масло, в том числе стерильные жидкости нефтяного, животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло и т.п. В качестве жидких носителей, в частности для инъекционных растворов, могут использоваться также физиологические растворы и водные растворы декстрозы, полиэтиленгликоля (PEG) и глицерина. Фармацевтическая композиция может дополнительно содержать дополнительные компоненты, например, консерванты, буферы, вещества, регулирующие тоничность, антиоксиданты и стабилизаторы, неионные увлажняющие и осветляющие средства, загустители и т.п. Фармацевтические композиции, описанные в данном документе, могут быть упакованы в единичные дозированные формы или

множественные дозированные формы. Как правило, композиции составляют в виде стерильного или практически изотонического раствора.

VII. Системы и наборы.

Композиции на основе гAAV, описанные в данном документе, могут содержаться в системе, предназначенной для применения в одном из способов по настоящему изобретению, описанных в данном документе.

Субретинальная доставка.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает систему для субретинальной доставки вектора в глаз индивидуума, содержащую: а) композицию, содержащую эффективное количество частиц гAAV, где i) капсидный белок частиц гAAV содержит одну или несколько аминокислотных замен в одном или нескольких положениях, в которых происходит взаимодействие с гепарансульфатсодержащим протеогликаном, и ii) вектор содержит гетерологичную нуклеиновую кислоту, кодирующую терапевтический полипептид или терапевтическую РНК, и по меньшей мере один концевой повтор AAV; и b) устройство для доставки гAAV в сетчатку.

Как правило, система содержит узкую канюлю, где канюля имеет калибр от 27 до 45, один или несколько шприцев (например, 1, 2, 3, 4 или более) и одну или несколько жидкостей (например, 1, 2, 3, 4 или более), подходящих для применения в способах по настоящему изобретению.

Узкая канюля подходит для субретинальной инъекции суспензии вектора и/или других жидкостей, подлежащих введению путем инъекции в субретинальное пространство. В некоторых вариантах осуществления канюля имеет калибр от 27 до 45. В некоторых вариантах осуществления узкая канюля имеет калибр 35-41. В некоторых вариантах осуществления узкая канюля имеет калибр 40 или 41. В некоторых вариантах осуществления узкая канюля имеет калибр 41. Канюля может представлять собой любой подходящий тип канюли, например, канюлю de-Juan® или канюлю Eagle®.

Шприц может представлять собой любой подходящий шприц, при условии, что его можно соединить с канюлей для доставки жидкости. В некоторых вариантах осуществления шприц представляет собой шприц системы Accurus®. В некоторых вариантах осуществления система имеет один шприц. В некоторых вариантах осуществления система имеет два шприца. В некоторых вариантах осуществления система имеет три шприца. В некоторых вариантах осуществления система имеет четыре или более шприцев.

Система может дополнительно содержать автоматический инъекционный насос, который можно активировать, например, ножной педалью.

Жидкости, подходящие для применения в способах по настоящему изобретению, включают жидкости, описанные в данном документе, например, одну или несколько жидкостей, каждая из которых содержит эффективное количество одного или нескольких векторов, описанных в данном документе, одну или несколько жидкостей для создания первоначального пузырька (например, физиологический раствор или другую подходящую жидкость) и одну или несколько жидкостей, содержащих одно или несколько терапевтических средств.

Жидкости, подходящие для применения в способах по настоящему изобретению, включают жидкости, описанные в данном документе, например, одну или несколько жидкостей, каждая из которых содержит эффективное количество одного или нескольких векторов, описанных в данном документе, одну или несколько жидкостей для создания первоначального пузырька (например, физиологический раствор или другую подходящую жидкость) и одну или несколько жидкостей, содержащих одно или несколько терапевтических средств.

В некоторых вариантах осуществления объем жидкости, содержащей эффективное количество вектора, составляет более чем приблизительно 0,8 мл. В некоторых вариантах осуществления объем жидкости, содержащей эффективное количество вектора, составляет по меньшей мере приблизительно 0,9 мл. В некоторых вариантах осуществления объем жидкости, содержащей эффективное количество вектора, составляет по меньшей мере приблизительно 1,0 мл. В некоторых вариантах осуществления объем жидкости, содержащей эффективное количество вектора, составляет по меньшей мере приблизительно 1,5 мл. В некоторых вариантах осуществления объем жидкости, содержащей эффективное количество вектора, составляет по меньшей мере приблизительно 2,0 мл. В некоторых вариантах осуществления объем жидкости, содержащей эффективное количество вектора, составляет более чем от приблизительно 0,8 до приблизительно 3,0 мл. В некоторых вариантах осуществления объем жидкости, содержащей эффективное количество вектора, составляет более чем от приблизительно 0,8 до приблизительно 2,5 мл. В некоторых вариантах осуществления объем жидкости, содержащей эффективное количество вектора, составляет более чем от приблизительно 0,8 до приблизительно 2,0 мл. В некоторых вариантах осуществления объем жидкости, содержащей эффективное количество вектора, составляет более чем от приблизительно 0,8 до приблизительно 1,5 мл. В некоторых вариантах осуществления объем жидкости, содержащей эффективное количество вектора, составляет более чем от приблизительно 0,8 до приблизительно 1,0 мл. В некоторых вариантах осуществления объем жидкости, содержащей эффективное количество вектора, составляет от приблизительно 0,9 до приблизительно 3,0 мл. В некоторых вариантах осуществления объем жидкости, содержащей эффективное количество вектора, составляет от приблизительно 0,9 до при-

близительно 2,5 мл. В некоторых вариантах осуществления объем жидкости, содержащей эффективное количество вектора, составляет от приблизительно 0,9 до приблизительно 2,0 мл. В некоторых вариантах осуществления объем жидкости, содержащей эффективное количество вектора, составляет от приблизительно 0,9 до приблизительно 1,5 мл. В некоторых вариантах осуществления объем жидкости, содержащей эффективное количество вектора, составляет от приблизительно 0,9 до приблизительно 1,0 мл. В некоторых вариантах осуществления объем жидкости, содержащей эффективное количество вектора, составляет от приблизительно 1,0 до приблизительно 3,0 мл. В некоторых вариантах осуществления объем жидкости, содержащей эффективное количество вектора, составляет от приблизительно 1,0 до приблизительно 2,0 мл.

Жидкость для создания первоначального пузырька может иметь объем, например, от приблизительно 0,1 до приблизительно 0,5 мл. В некоторых вариантах осуществления общий объем всех жидкостей в системе составляет от приблизительно 0,5 до приблизительно 3,0 мл.

В некоторых вариантах осуществления система содержит одну жидкость (например, жидкость, содержащую эффективное количество вектора). В некоторых вариантах осуществления система содержит 2 жидкости. В некоторых вариантах осуществления система содержит 3 жидкости. В некоторых вариантах осуществления система содержит 4 или более жидкостей.

Системы по настоящему изобретению могут быть дополнительно упакованы в наборы, где наборы могут дополнительно содержать инструкции по применению. В некоторых вариантах осуществления наборы дополнительно содержат устройство для субретинальной доставки композиций на основе частиц гAAV. В некоторых вариантах осуществления инструкции по применению включают инструкции в соответствии с одним из способов, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления инструкции по применению включают инструкции по субретинальной доставке частиц гAAV, содержащих капсид с одной или несколькими аминокислотными заменами, которые изменяют, ослабляют или устраняют связывание частицы гAAV с HSPG.

Доставка в CNS.

Настоящее изобретение предусматривает наборы для доставки гетерологичной нуклеиновой кислоты в CNS индивидуума, содержащие композицию, содержащую частицы гAAV, где частица гAAV содержит (а) капсид гAAV, содержащий капсидные белки гAAV, содержащие одну или несколько аминокислотных замен в одном или нескольких положениях, в которых происходит взаимодействие с гепарансульфатсодержащим протеогликаном, и (b) вектор на основе гAAV, содержащий гетерологичную нуклеиновую кислоту и по меньшей мере один инвертированный концевой повтор AAV. В данном документе дополнительно предусмотрены наборы для лечения нарушения со стороны CNS у индивидуума, содержащие композицию, содержащую частицы гAAV, где частица гAAV содержит (а) капсид гAAV, содержащий капсидные белки гAAV, содержащие одну или несколько аминокислотных замен в одном или нескольких положениях, в которых происходит взаимодействие с гепарансульфатсодержащим протеогликаном, и (b) вектор на основе гAAV, содержащий гетерологичную нуклеиновую кислоту для лечения нарушения со стороны CNS и по меньшей мере один инвертированный концевой повтор AAV.

Наборы могут содержать любые из частиц гAAV или композиций на основе частиц гAAV по настоящему изобретению. Например, наборы могут содержать частицы гAAV с капсидом гAAV, содержащим капсидные белки гAAV, содержащие одну или несколько аминокислотных замен в одном или нескольких положениях, в которых происходит взаимодействие с гепарансульфатсодержащим протеогликаном (например, одну или несколько аминокислотных замен, которые ослабляют связывание частицы гAAV с гепарансульфатсодержащим протеогликаном, таких как замены R484, R487, K527, K532, R585 и/или R588, нумерация для которых приведена согласно VP1 AAV2), и вектором на основе гAAV, содержащим гетерологичную нуклеиновую кислоту и по меньшей мере один инвертированный концевой повтор AAV.

В некоторых вариантах осуществления наборы дополнительно содержат устройство для доставки в CNS композиции на основе частиц гAAV. Устройства для доставки в CNS (например, для доставки композиции, содержащей частицы гAAV) известны из уровня техники, и в них может использоваться насос (например, осмотический и/или инфузионный насос, описанный ниже) и инъекционное устройство (например, катетер, канюля и т.д.). Для направления инъекционного устройства и/или контроля доставки инфузата (например, композиции, содержащей частицы гAAV) необязательно можно применять методику визуализации. Доставка в CNS может включать доставку посредством стереотаксической инъекции или посредством конвекционной доставки (CED). Инъекционное устройство может быть вставлено в ткань CNS субъекта. Специалист в данной области способен определить подходящие координаты для размещения инъекционного устройства в ткани-мишени CNS. В некоторых вариантах осуществления размещение выполняют при помощи анатомической карты, полученной, например, путем СТ- и/или MRI-визуализации головного мозга субъекта для направления инъекционного устройства в ткань-мишень CNS.

В некоторых вариантах осуществления можно проводить интраоперационную магнитно-резонансную визуализацию (iMRI) и/или визуализацию доставки в режиме реального времени. В некоторых вариантах осуществления устройство применяют для введения частиц гAAV млекопитающему с

помощью способов по настоящему изобретению. Из уровня техники известно, что iMRI является основанной на MRI методикой визуализации пациента в ходе хирургического вмешательства, которая помогает подтвердить успешность хирургической процедуры (например, доставки частиц gAAV в CNS) и снижает риск повреждения других частей ткани (в отношении дополнительного описания см., например, Fiandaca et al. (2009) *Neuroimage* 47 Suppl. 2:T27-35). В некоторых вариантах осуществления для обеспечения контроля распределения инфузата в ткани в режиме реального времени совместно с инфузатом (например, композицией, содержащей частицы gAAV) можно доставлять индикаторное средство (например, средство, улучшающее контрастность при MRI). См., например, Fiandaca et al. (2009) *Neuroimage* 47 Suppl. 2:T27-35; публикацию заявки № 2007/0259031 до выдачи патента США и патент США № 7922999. Применение индикаторного средства может давать информацию для прекращения доставки. Другие индикаторные и визуализирующие средства, известные из уровня техники, также можно применять для отслеживания распределения инфузата.

В некоторых вариантах осуществления частицы gAAV можно вводить посредством стандартной стереотаксической (выражение "стереотаксическая" может использоваться в данном документе взаимозаменяемо) инъекции с помощью устройств и способов, известных из уровня техники, для доставки частиц gAAV. Как правило, в этих способах могут применять инъекционное устройство, систему планирования для перевода области ткани, намеченной для доставки, в набор координат (например, параметры по латеро-латеральной, дорсо-вентральной и росто-каудальной осям) и устройство для стереотаксической локализации в соответствии с запланированными координатами (например, стереотаксическое устройство, необязательно содержащее зонд и структуру для фиксации головы на месте сообразно системе координат). Неограничивающим примером системы, которая может быть применимой для хирургического вмешательства под контролем MRI и/или стереотаксической инъекции, является система ClearPoint® (MRI Interventions, Мемфис, Теннесси).

Другим иллюстративным и неограничивающим способом доставки частицы gAAV в CNS является конвекционная доставка (CED). Используемое в данном документе выражение "конвекционная доставка (CED)" может относиться к доставке терапевтического средства в CNS путем инфузии со скоростью, при которой гидростатическое давление приводит к конвекционному распределению. В некоторых вариантах осуществления инфузию проводят при скорости, превышающей 0,5 мкл/мин. Тем не менее, можно применять любую подходящую скорость потока, такую, при которой внутричерепное давление поддерживается на подходящих уровнях, чтобы не повредить ткань головного мозга. CED можно выполнять, например, путем применения подходящего катетера или канюли (например, канюли со ступенчатым дизайном, не допускающей обратного тока) посредством размещения кончика канюли, по меньшей мере, в непосредственной близости к ткани-мишени CNS (например, кончик вставляют в ткань CNS). После размещения канюли ее соединяют с насосом, который доставляет терапевтическое средство через кончик канюли в ткань-мишень CNS. В ходе инфузии можно поддерживать градиент давления на кончике канюли. В некоторых вариантах осуществления инфузию можно контролировать с помощью индикаторного средства, выявляемого с помощью способа визуализации, такого как интраоперационная MRI (iMRI) или другая методика MRI в режиме реального времени.

CED основана на закачивании инфузата (например, композиции, содержащей частицу gAAV) в CNS под давлением, при котором преодолевается гидростатическое давление тканевой жидкости. В результате этого инфузат приводится в контакт с околососудистой тканью CNS, которая используется как насос для распределения инфузата путем конвекции и повышения степени его доставки (см., например, Hadaczek et al. (2006) *Hum. Gene Ther.* 17:291-302; Bankiewicz et al. (2000) *Exp. Neurol.* 164:2-14; Sanftner, LM et al. (2005) *Exp. Neurol.* 194(2):476-483; Forsayeth, JR et al. (2006) *Mol. Ther.* 14(4):571-577; патент США № 6953575; публикацию заявки на патент США № 2002/0141980; публикацию заявки на патент США № 2007/0259031 и WO 2010/088560).

В некоторых вариантах осуществления устройство для конвекционной доставки включает в себя осмотический насос и/или инфузионный насос. Осмотические и/или инфузионные насосы являются коммерчески доступными (например, от ALZET® Corp., Hamilton Corp., ALZA Inc. в Пало-Альто, Калифорния). Насосные системы могут быть имплантируемыми. Иллюстративные насосные системы могут быть найдены, например, в патентах США № 7351239; 7341577; 6042579; 5735815 и 4692147. Иллюстративные устройства для CED, в том числе канюли с системой противодействия обратному току и ступенчатые канюли, могут быть найдены в WO 99/61066 и WO 2006/042090, которые включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

В некоторых вариантах осуществления устройство для конвекционной доставки включает в себя канюлю с системой противодействия обратному току (например, не допускающую обратного тока канюлю со ступенчатым дизайном). Дополнительное описание и иллюстративные канюли с системой противодействия обратному току могут быть найдены, например, в Krauze et al. (2009) *Methods Enzymol.* 465:349-362; публикации заявки № 2006/0135945 до выдачи патента США; публикации заявки № 2007/0088295 до выдачи патента США и PCT/US08/64011. В некоторых вариантах осуществления применяют только одну канюлю. В других вариантах осуществления применяют несколько канюль. В некоторых вариантах осуществления устройство для конвекционной доставки включает в себя канюлю с сис-

темой противодействия обратному току, присоединенную к насосу, который создает давление, достаточное для того, чтобы вызвать поток инфузата через канюлю в ткань-мишень с регулируемой скоростью. Можно применять любую подходящую скорость потока, такую, при которой внутричерепное давление поддерживается на подходящих уровнях, чтобы не повредить ткань головного мозга.

В некоторых вариантах осуществления проникновение инфузата дополнительно увеличивают путем применения облегчающего средства. Облегчающее средство способно дополнительно облегчать доставку инфузата в ткань-мишень (например, в ткань-мишень CNS). Неограничивающим примером облегчающего средства является низкомолекулярный гепарин (см., например, патент США № 7922999).

В некоторых вариантах осуществления наборы дополнительно содержат инструкции по доставке в CNS композиции на основе частиц гAAV. Наборы, описанные в данном документе, могут дополнительно включать другие материалы, требуемые с коммерческой и потребительской точки зрения, в том числе другие буферы, разбавители, фильтры, иглы, шприцы и вкладыши с инструкциями для выполнения любых способов, описанных в данном документе. Подходящие упаковочные материалы также могут быть включены и могут представлять собой любые упаковочные материалы, известные в данной области техники, включающие, например, колбы (такие как герметичные колбы), сосуды, ампулы, бутылки, банки, гибкую упаковку (например, герметичные майларовые или пластиковые пакеты) и т.п. Такие изделия можно дополнительно стерилизовать и/или герметизировать. В некоторых вариантах осуществления наборы содержат инструкции по лечению нарушения со стороны CNS, описанного в данном документе, с применением любых из способов и/или частиц гAAV, описанных в данном документе. Наборы могут содержать фармацевтически приемлемый носитель, подходящий для инъекции в CNS индивидуума, и одно или несколько из буфера, разбавителя, фильтра, иглы, шприца и вкладыша в упаковку с инструкциями по выполнению инъекций в CNS индивидуума.

Наполнители.

В некоторых вариантах осуществления, относящихся к субретинальной доставке и/или доставке в CNS, наборы дополнительно содержат буферы и/или фармацевтически приемлемые наполнители. Как хорошо известно из уровня техники, фармацевтически приемлемые наполнители представляют собой относительно инертные вещества, облегчающие введение фармакологически эффективного вещества, и могут поставляться в виде жидких растворов или суспензий, в виде эмульсий или в виде твердых форм, подходящих для растворения или суспендирования в жидкости перед применением. Например, наполнитель может придавать форму или консистенцию или выступать в качестве разбавителя. Подходящие наполнители включают, без ограничения, стабилизаторы, смачивающие и эмульгирующие средства, соли для изменения осмолярности, инкапсулирующие средства, буферные вещества для поддержания pH и буферы. Такие наполнители включают любое фармацевтическое средство, подходящее для прямой доставки в глаз, которое можно вводить без излишней токсичности. Фармацевтически приемлемые наполнители включают, без ограничения, сорбит, любое из различных соединений TWEEN и жидкости, такие как вода, физиологический раствор, глицерин и этанол. В них могут быть включены фармацевтически приемлемые соли, например, соли минеральных кислот, такие как гидрохлориды, гидробромиды, фосфаты, сульфаты и т.п.; и соли органических кислот, такие как ацетаты, пропионаты, малонаты, бензоаты и т.п. Всестороннее обсуждение фармацевтически приемлемых наполнителей доступно в REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Mack Pub. Co., N.J. 1991).

В некоторых вариантах осуществления, относящихся к субретинальной доставке и/или доставке в CNS, фармацевтически приемлемые наполнители могут включать фармацевтически приемлемые носители. Такими фармацевтически приемлемыми носителями могут быть стерильные жидкости, такие как вода и масло, в том числе стерильные жидкости нефтяного, животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло и т.п. В качестве жидких носителей, в частности для инъекционных растворов, могут использоваться также физиологические растворы и водные растворы декстрозы, полиэтиленгликоля (PEG) и глицерина. Также можно применять дополнительные ингредиенты, например, консерванты, буферы, средства, регулирующие тоничность, антиоксиданты и стабилизаторы, неионные увлажняющие или осветляющие средства, средства, повышающие вязкость, и т.п. Наборы, описанные в данном документе, могут быть упакованы в единичные дозированные формы или в многодозовые формы. Содержание наборов, как правило, составляют в виде стерильного и практически изотонического раствора.

Примеры

Настоящее изобретение будет более понятным со ссылкой на следующие примеры. Тем не менее, не следует их истолковывать, как ограничивающие объем настоящего изобретения. Понятно, что описанные в данном документе примеры и варианты осуществления имеют место только в качестве иллюстрации, и что различные модификации или изменения с их учетом будут предложены специалистам в данной области техники и должны быть включены в сущность и содержание данной заявки, а также объемом прилагаемой формулы изобретения.

Пример 1. Мутации в аргининовых остатках, необходимых для связывания с HSPG, снижают уровень опосредованной AAV2 трансдукции в культивируемых линиях клеток.

Векторы на основе AAV2 для генной терапии в настоящее время применяются в клинических ис-

пытаниях в отношении глазных показаний. Эти векторы можно доставлять посредством интравитреального пути введения, что приводит к трансдукции ганглионарных клеток и клеток Мюллера в сетчатке мышей и отличных от человека приматов, или посредством субретинального пути введения, нацеленного на клетки пигментного эпителия и фоторецепторные клетки сетчатки. Различные серотипы AAV используют различные рецепторы и корецепторы клеточной поверхности для инфицирования. Известно, что основным рецептором клеточной поверхности для AAV2 является гепарансульфатсодержащий протеогликан (HSPG) (Summerford, C. and Samulski, R.J. (1998) *J. Virol.* 72(2): 1438-45). Понимание механизма, посредством которого AAV2 осуществляет трансдукцию в сетчатке, важно для дальнейшей разработки векторов на основе AAV для генной терапии.

Для исследования роли связывания с HSPG в трансдукции, опосредованной AAV2, в сетчатке создавали векторы на основе AAV2 с капсидными белками, несущими мутации в аргининовых остатках, которые, как известно, необходимы для связывания с HSPG (AAV2 HBKO). Эти векторы приводили к значительному снижению трансдукции клеток 293 и HeLa в культуре по сравнению с AAV2 дикого типа. Вектор AAV2HBKO, доставляемый субретинально в глаз мыши, неожиданно приводил к 2-кратному логарифмическому повышению трансдукции по сравнению с AAV2 дикого типа. Однако в случаях, когда вектор AAV2HBKO доставляли интравитреально, трансдукция не проявлялась. Эти результаты указывают на то, что мутации аминокислот, необходимых для связывания с HSPG, оказывают противоположные эффекты на эффективность трансдукции после субретинальной и интравитреальной инъекции частиц AAV2.

Способы.

Конструирование плазмиды на основе AAV2 с мутацией по аргинину.

Плазмиду pIM45BD, несущую *rep/cap* AAV2, подвергали мутации с помощью набора Quikchange Lightning для мутагенеза, направленного на несколько сайтов (Agilent Technologies). Для введения изменений аргининовых остатков 585 и 588 на аланиновые остатки был сконструирован праймер для мутагенеза с помощью ПЦР. Положительные мутантные формы подтверждали путем секвенирования.

Создание векторов на основе gAAV.

Рекомбинантные векторы на основе AAV, экспрессирующие улучшенный зеленый флуоресцентный белок (EGFP) или растворимый гибридный рецептор VEGF (sFLT02), получали путем тройной трансфекции клеток 293 с применением плазмиды pIM45BD или pIM45BDR585A/R588A, несущей *rep/cap*, и плазмиды-помощника pAd. Трансгены находились под контролем промотора β -актина курицы (CBA) или родопсинкиназы человека (RK).

Анализ трансдукции *in vitro*.

Клетки 293 или HeLa высевали в 24-луночные планшеты ($1-2 \times 10^5$ клеток на лунку). Через 24 ч после высевания клетки инфицировали 1×10^3 vg/клетка (+) Ad5ts149. Эффективность трансдукции измеряли через 48 ч после инфицирования по флуоресценции EGFP либо с помощью ELISA для количественной оценки sFLT02 в среде (ELISA для растворимого VEGFR1 человека от R&D Systems).

Животные.

Взрослых мышей C57BL/6, которых получали от Jackson Laboratories (Бар-Харбор, Мэн), приобретали и содержали в виварии Genzyme. Животным предоставляли свободный доступ к пище и воде в течение всего периода проведения исследования. Все процедуры проводили согласно протоколу, утвержденному Институциональным комитетом по уходу за животными и их использованию.

Интравитреальная инъекция.

Индукцировали и поддерживали оцепенение с помощью 3,5% изофлурана, вводимого в кислороде, доставляемом животному через дыхательный контур, при скорости 800 мл/минута. Один микролитр тестируемого препарата вводили путем инъекции в жидкую часть стекловидного тела при помощи шприца от Hamilton, оснащенного скошенной иглой 33 калибра (Hamilton Co., Рино, Невада). Иглу направляли через склеру примерно на 2 мм ниже лимба роговицы и осторожно продвигали в стекловидную камеру во избежание контакта с хрусталиком. Тестируемый препарат доставляли в течение периода 1-2 с. После инъекции иглу удерживали в рабочем положении в течение примерно 5 с до извлечения. Животному давали возможность восстановиться после анестезии до возвращения его в клетку.

Субретинальная инъекция.

Индукцировали мидриаз и циклоплегию путем местного применения тропикамида (Alcon, Форт-Уэрт, Техас). Индуцировали и поддерживали оцепенение с помощью 3,5% изофлурана, вводимого в кислороде, доставляемом животному через дыхательный контур, при скорости 800 мл/минута. Глаз обездвигивали при помощи щипцов с кольцеобразными кончиками (World Precision Instruments, Сарасота, Флорида) и пробный надрез выполняли примерно на 2 мм ниже лимба роговицы в склере при помощи иглы 30 калибра. Тупоконечную иглу 33 калибра направляли через надрез и продвигали кзади до проникновения кончика в заднюю нейросенсорную часть сетчатки. Один микролитр тестируемого препарата доставляли в течение 1 с. Иглу удерживали в рабочем положении в течение примерно 5 с перед извлечением. Животному давали возможность восстановиться после анестезии до возвращения его в клетку.

Гистологический анализ на EGFP.

Исходный сигнал от EGFP наблюдали с помощью эпифлуоресцентного микроскопа на зафиксированных в формалине глазах, подвергнутых проводке для заливки в парафин.

Результаты.

Как изображено на фиг. 1, было показано, что пять остатков капсида являются критически важными для связывания AAV2 с HSPG. Конструировали мутантную форму AAV2, несущую две аминокислотные замены этих остатков: R585A и R588A (нумерация приведена по аминокислотной последовательности VP1). Эту мутантную форму, называемую HBKO, тестировали в отношении ее способности к трансдукции клеток в культуре.

Линии клеток человека выращивали в культуре и трансдуцировали частицами AAV2 дикого типа или мутантной формы HBKO. Для измерения эффективности трансдукции вирусные геномы обоих типов частиц AAV2 модифицировали для включения трансгенов с применением универсального промотора CBA для управления экспрессией растворимого Flt (рецептора 1 VEGF человека). Через 48 ч после трансдукции эффективность трансдукции измеряли с помощью иммунологического анализа на основе ELISA для оценки количества образовавшегося Flt. На фиг. 2 продемонстрировано, что мутантная форма HBKO проявляла значительно сниженную способность к трансдукции клеток 293 человека в культуре. В случае применения равных количеств частиц AAV2 и клеток 293 мутантная форма HBKO проявляла 99,6% снижение эффективности трансдукции по сравнению с диким типом.

Для измерения этого эффекта в нескольких линиях клеток человека клетки 293 и HeLa трансдуцировали, как описано выше. Для этих анализов векторы модифицировали для экспрессии EGFP, а не Flt, под контролем промотора CBA. На фиг. 3 показано, что согласно измерению по флуоресценции EGFP AAV2 дикого типа был способен трансдуцировать обе линии клеток. В отличие от этого, мутантная форма HBKO характеризовалась существенным снижением уровня трансдукции обеих линий клеток. Эти результаты подтверждают, что мутантная форма HBKO обладала существенно сниженной способностью к трансдукции линий клеток эмбриональных почек и раковых клеток шейки матки человека в культуре.

Пример 2. Мутации в аргининовых остатках, необходимых для связывания с HSPG, оказывают противоположные эффекты на опосредованную AAV2 трансдукцию после интравитреальной и субретинальной инъекции.

Способность частиц AAV2 мутантной формы HBKO к трансдукции клеток глаза при интравитреальной и субретинальной инъекциях тестировали на мышах. На фиг. 4A и 4B сравнивается эффективность трансдукции частиц AAV2 дикого типа и HBKO при интравитреальной или субретинальной инъекции. В этих экспериментах эффективность трансдукции анализировали путем измерения экспрессии растворимого Flt (sFLT) при трансдукции частицами AAV2, несущими трансген, в которых применяется универсальный промотор CBA для управления экспрессией Flt. В случае применения интравитреальной инъекции мутантная форма HBKO проявляла значительно сниженную способность к трансдукции клеток (фиг. 4A).

Мутантная форма HBKO неожиданно проявляла усиленную трансдукцию после субретинальной инъекции (фиг. 4B). Это повышение неизменно наблюдали, если количество геномов векторов на основе AAV2, вводимых путем инъекции, варьировало в 10 раз (10^8 и 10^9 vg, как отмечено). Эти результаты отличаются от результатов, наблюдаемых в культивируемых линиях клеток и при интравитреальной инъекции. Эти данные указывают на важность способности к связыванию с HSPG в опосредовании трансдукции различных типов клеток глаза и слоев сетчатки с помощью различных типов внутриглазных инъекций.

Для визуализации трансдукции клеток сетчатки применяли частицы AAV2 дикого типа или мутантной формы HBKO, несущие трансген, экспрессирующий EGFP под контролем универсального промотора CBA. Как показано на фиг. 5, частицы AAV2 дикого типа были способны к трансдукции в сетчатке после интравитреальной инъекции, что демонстрировалось по флуоресценции GFP. Однако частицы мутантной формы AAV2 HBKO не проявляли выявляемую флуоресценцию GFP при интравитреальной инъекции. Эти результаты соответствуют результатам, представленным на фиг. 4A.

На фиг. 6 приведена количественная оценка эффективности трансдукции частицами AAV2 дикого типа (AAV2 CBA) и мутантной формы HBKO (AAV2 CBA HBKO) при субретинальной инъекции. Для измерения трансдукции оба типа частиц AAV2 имели геномы векторов, содержащие трансген, экспрессирующий Flt при помощи универсального промотора CBA. Для инъекций применяли два количества геномов векторов, как указано на фиг. 6. Эти результаты подтверждают наблюдение, показанное на фиг. 4B, и демонстрируют неожиданное обнаружение того, что мутация остатков, необходимых для связывания с HSPG, повышает способность AAV2 к трансдукции клеток после субретинальной инъекции.

Для визуализации трансдукции применяли частицы AAV2 дикого типа или мутантной формы HBKO, несущие трансген, экспрессирующий EGFP под контролем универсального промотора CBA. Как показано на фиг. 7, флуоресценция GFP в сетчатке усиливается при трансдукции частицами мутантной формы AAV2 HBKO по сравнению с диким типом.

Поскольку известно, что субретинальная инъекция нацелена на слои клеток с фоторецепторными

клетками, изучали способность частиц мутантной формы AAV2 HBKO к трансдукции фоторецепторов. В глазу промотор родопсинкиназы (RK), как известно, управляет специфической экспрессией в фоторецепторных клетках, таких как палочковые и колбочковые клетки (Khan, S.C., et al. (2007) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 48(9):3954-61). Поэтому частицы AAV2 дикого типа и мутантной формы HBKO создавали с геномами векторов, несущими трансген, в которых для управления экспрессией Flt применяется промотор RK. Как показано на фиг. 8, частицы мутантной формы AAV2 HBKO проявляли усиленную трансдукцию фоторецепторных клеток после субретинальной инъекции по сравнению с диким типом. Это наблюдение неизменно наблюдали при инъекции отличающихся в 10 раз количеств геномов векторов (10^8 и 10^9 vg, как отмечено). Эти результаты демонстрируют неожиданный результат, заключающийся в том, что мутация остатков, необходимых для связывания с HSPG, усиливает способность частиц AAV2 к трансдукции фоторецепторных клеток сетчатки после субретинальной инъекции. Мутация этих остатков представляет собой потенциальный способ усиления трансдукции фоторецепторных клеток для опосредованной AAV2 генной терапии.

AAV представляет собой одноцепочечный не имеющий оболочки ДНК-содержащий вирус, который является членом семейства парвовирусов. Различные серотипы AAV, включающие AAV1, AAV2, AAV4, AAV5, AAV6 и т.д., демонстрируют различные профили распределения в тканях. Разнообразие тканевых тропизмов этих капсидов AAV позволило применять векторы на основе AAV для широкого применения в переносе генов как *in vitro*, так и *in vivo*, в печени, скелетных мышцах, головном мозге, сетчатке, сердце и спинном мозге (Wu, Z., et al. (2006) *Molecular Therapy*, 14: 316-327). Прикрепление вируса к клетке-хозяину требует специфических взаимодействий капсида вируса с молекулами клеточных рецепторов. Ранее было показано, что капсид AAV2 использует гепарансульфатсодержащий протеогликан (HSPG), интегрин V 5 и рецептор 1 фактора роста фибробластов человека в качестве первичных и вторичных рецепторов для опосредования поступления в клетку векторов на основе AAV2 для генной терапии (Summerford, C. and R.J. Samulski (1998) *J. Virology*, 72: 1438-1445; Summerford, C. et al. (1999) *Nat. Medicine*, 5: 78-82; Qing, K., et al. (1999) *Nat. Medicine*, 5: 71-77). Мутационный анализ капсидных белков AAV2 показал, что группа основных аминокислот, а именно аргининовые остатки R484, R487, R585, R588 и лизиновый остаток K532, вносит вклад в связывание с гепараном, а также в трансдукцию клеток *in vitro* и трансдукцию в печени *in vivo* векторами на основе AAV2. Мутации в этих аминокислотных остатках приводили к значительному снижению уровня трансдукции в печени векторами на основе AAV2 при внутривенном пути введения и увеличению переноса генов в сердце и скелетных мышцах (Kern, A. et al. (2003) *J. Virology*, 11:11072-11081; Muller, O.J. et al. (2006) *Cardiovascular Research*, 70:70-78).

Роль этих основных аминокислот исследовали по трансдукции векторами на основе AAV2 в сетчатке как при интравитреальном пути, так и при субретинальном пути введения векторов. Мутация R585 и R588 в значительной степени устраняла трансдукцию клеток HEK293 и клеток HeLa *in vitro* (фиг. 2 и 3). У Dalkara D и соавт., ((2009) *Molecular Therapy*, 17:2096-2102) предположено, что доставляемые интравитреально векторы на основе AAV2 неспособны проникать в наружную часть сетчатки по причине связывания с гепарансульфатсодержащими протеогликанами, широко распространенными во внутренней пограничной мембране сетчатки. Как показано в настоящих примерах, при интравитреальной доставке векторы с мутацией R585/R588 в меньшей степени способны к трансдукции во внутренней части сетчатки по сравнению с векторами на основе AAV2 дикого типа (фиг. 4А и 5), что позволяет предположить, что связывание с HSPG важно для интравитреальной трансдукции в сетчатке. Субретинальная доставка векторов на основе AAV2 приводит к преимущественной трансдукции клеток пигментного эпителия сетчатки (RPE) и некоторой трансдукции фоторецепторных клеток. Неожиданно было обнаружено, что векторы с мутацией R585/R588 осуществляют трансдукцию в наружной части сетчатки по меньшей мере в 10 раз лучше, чем векторы на основе AAV2 дикого типа (фиг. 4В, 6 и 7). В случае применения специфического для фоторецепторов промотора родопсинкиназы (RK) экспрессия трансгена в фоторецепторах значительно повышается при использовании вектора на основе AAV2 с мутацией R585/R588 (фиг. 8). Эти векторы, опирающиеся на мутации в основных аминокислотных остатках капсида AAV2, будут весьма благоприятными для трансдукции в наружной сетчатке, особенно в отношении фоторецепторных клеток, для лечения ряда нарушений со стороны сетчатки.

Пример 3. Обширная экспрессия GFP после интрастриарной доставки вектора на основе AAV2HBKO.

Посредством сайт-направленных мутаций, вводимых в капсид AAV2, создавали вектор на основе мутантной формы AAV2 HBKO, неспособный к связыванию с гепарином. Профиль трансдукции этого вектора на основе HBKO оценивали в модели на мышах как дикого типа, так и имеющих HD (YAC128), с применением однократных интрастриарных инъекций.

Способы.

Конструирование плазмиды на основе AAV2 с мутацией по аргинину.

Плазмиду pIM45BD, несущую *her/cap* AAV2, подвергали мутации с помощью набора Quikchange Lightning для мутагенеза, направленного на несколько сайтов (Agilent Technologies). Для введения изменений аргинина на аланин в остатках 585 и 588 был сконструирован праймер для мутагенеза с помощью

ПЦР. Положительные мутантные формы подтверждали путем секвенирования.

Получение векторов на основе AAV.

Рекомбинантные векторы на основе AAV получали путем тройной трансфекции (с применением фосфата кальция) клеток эмбриональной карциномы почки человека 293 (НЕК-293), как описано ранее (Xiao et al. (1998) J. Virol. 72:2224-2232). Вкратце, применяли плазмиду, содержащую ген гер из серотипа 2 и ген капсидного белка из серотипа 1 либо 2 вместе с аденовирусной плазмидой-помощником (Stratagene, Пало-Альто, Калифорния). Трансгены находились под контролем промотора бета-актина курицы (CBA). Вирус собирали через 72 ч после трансфекции и очищали на колонке, как описано ранее (Xiao et al. (1998) J. Virol. 72:2224-2232).

Животные.

Все процедуры проводили с применением протокола, утвержденного Институциональным комитетом по уходу за животными и их использованию в Genzyme, компании Sanofi (Министерство здравоохранения и социальных служб, публикация NIH 86-23). Используемые мыши включали мышей YAC128 (искусственная хромосома дрожжей, несущая полноразмерный мутантный трансген НТТ человека со 128 повторами CAG, в генетическом окружении чистой линии FVB/NJ) и мышей из одного помета FVB/NJ дикого типа (Slow et al. (2003) Hum. Mol. Genet. 12:1555-1567; Van Raamsdonk et al. (2005) Hum. Mol. Genet. 14:3823-3835). Как мышей YAC128, так и мышей из одного помета FVB/NJ получали из колонии Genzyme, которую содержали в Charles River Laboratories. Мышей выдерживали при 12-часовом цикле чередования света и темноты с пищей и водой, доступными в неограниченном количестве. Все поведенческие тесты проводили в течение светового цикла для животных (между 8 часами утра и 4 часами дня). N-значения для всех экспериментов приведены в табл. 2 и 3 ниже.

Таблица 2

Мыши дикого типа, обработанные частицами AAV, экспрессирующими GFP (эксперимент 1)

Обработка	n-значение (мыши WT)	Доза (DRP)
AAV2HBKO-CBA-GFP	6	6x10 ⁹
AAV2-CBA-GFP	6	6x10 ⁹

Таблица 3

Мыши YAC128, обработанные частицами AAV, экспрессирующими miRNA Htt и GFP (эксперимент 2)

Обработка	n-значение (мыши YAC128)	Доза (DRP)
AAV2HBKO-CBA-miRNA-Htt-GFP	8	6x10 ⁹
AAV1-CBA-miRNA-Htt-GFP	8	1.5x10 ¹⁰
Необработанные	8	Не применимо

Хирургические процедуры.

Животных анестезировали с помощью 3% изофлурана и помещали в стереотаксическую раму. Внутречерепные инъекции проводили, как описано ранее (Stanek et al. (2014) Hum. Gene Ther. 25:461-474). Вкратце, 3 мкл рекомбинантных вирусных векторов вводили путем инъекции в полосатое тело (AP, + 0,50; ML, ± 2,00; DV, -2,5 от брегмы и твердой мозговой оболочки; опора верхней челюсти, 0,0) при помощи шприца Гамильтона на 10 мкл при скорости 0,5 мкл/мин. Иглу оставляли на месте в течение 1 мин. после завершения инфузии. За час до хирургического вмешательства и в течение 24 ч. после хирургического вмешательства мышам подкожно вводили кетопрофен (5 мг/кг) для обезболивания.

Перфузия и сбор тканей у животных.

Мышам проводили перфузию сердца фосфатно-солевым буферным раствором (PBS) для удаления всей крови. Для эксперимента 1 головные мозги вырезали вдоль коронарной плоскости и подвергали дополнительной фиксации в 4% параформальдегиде, а затем в 30% сахарозе. С применением криостата нарезали коронарные срезы на 20 мкм. Для эксперимента 2 головные мозги вырезали в сагиттальной плоскости вдоль срединной линии и левое полушарие подвергали дополнительной фиксации в 4% параформальдегиде, а затем в 30% сахарозе и после этого разрезали на срезы на 20 мкм с применением криостата. Правое полушарие (применяемое для биохимических анализов) вырезали вдоль коронарной оси с применением матрицы для головного мозга мыши (Harvard Apparatus, Холлистон, Массачусетс) и стриарные и корковые области иссекали с помощью иглы для биопсии на 3 мм. Ткань головного мозга затем мгновенно замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C до применения.

Количественная ПЦР в режиме реального времени (TaqMan)

Уровни РНК измеряли с помощью количественной RT-PCR в режиме реального времени. Для всех анализов по методу RT-PCR применяли биоптаты полосатого тела. Общую РНК экстрагировали с помощью набора QIAGEN RNEasy Mini и затем подвергали обратной транскрипции и амплификации с помощью набора TaqMan® One-Step RT-PCR Master Mix (Applied Biosystems) согласно инструкциям производителя. Реакции количественной RT-PCR в формате TaqMan проводили и анализировали в системе ПНР в реальном времени ABI PRISM® 7500 (Applied Biosystems). Уровни экспрессии мРНК НТТ нормализовали по уровням мРНК гипоксантингуанинфосфорибозилтрансферазы 1 (HPRT1). Калибровочные кривые строили с применением 5-кратных серийных разведений к ДНК головного мозга мыши. Каждый об-

разец анализировали в двух повторностях. Относительную экспрессию генов определяли путем применения калибровочной кривой или способа $\Delta\Delta C_T$ и нормализации по уровням мРНК HPRT1. Для выявления НТТ человека применяли следующие праймеры: 5'-CTCCGTCCGGTAGACATGCT-3' и 5'-CCATTTTGAGGGTTCTGATTTCC-3'. Для выявления НТТ мыши применяли следующие праймеры: 5'-TGCTACACCTGACAGCGAGTCT-3' и 5'-ATCCCTTGC GGATCCTATCA-3'.

Вестерн-блоттинг.

Уровни белков измеряли с помощью вестерн-блот-анализа. Для всех вестерн-блот-анализов применяли биоптаты коры. Ткани в конечной концентрации 50 мг/мл в буфере для лизиса T-Per (Pierce), содержащем полный коктейль ингибиторов протеаз (Roche), гомогенизировали. Гомогенаты очищали путем центрифугирования при 10000×g в течение 6 мин. при 4°C. Концентрацию белка измеряли путем применения анализа с BSA (Pierce). Двадцать-тридцать микрограммов гомогенатов разделяли на 3-8% трис-ацетатном геле Novex и затем переносили на нитроцеллюлозную мембрану. Мембраны зондировали моноклональным антителом мыши к гентингтину (Mab2166; разведение 1:2000, Millipore) и поликлональным антителом кролика к β -тубулину (разведение 1:750, Santa Cruz Biotechnology). Мембраны затем инкубировали со вторичными антителами, конъюгированными с красителями, поглощающими в инфракрасной области (разведение 1:20000, Rockland), и белки визуализировали посредством количественной флуоресценции с применением Odyssey (LI-COR Biosciences). Для контроля отклонений нагрузки уровень белка Htt нормализовали по β -тубулину и выражали в виде процентной доли необработанных или обработанных физиологическим раствором животных. Для подтверждения идентичности белков применяли маркеры молекулярной массы.

Иммуногистохимический анализ.

Замороженные срезы головного мозга окрашивали антителом кролика к GFAP для окрашивания астроцитов (1:2500; DAKO, Глоstrup, Германия) либо антителом к Iba1 для визуализации микроглии (1:500; WAKO Chemicals USA, Ричмонд, Виргиния). Применяемые вторичные антитела представляли собой антивидовые специфичные антитела ослы, конъюгированные с FITC или Cy3. Срезы визуализировали с помощью флуоресцентного микроскопа Nikon Eclipse E800 (Nikon, Мелвилл, Нью-Йорк).

Статистические анализы.

Для статистических анализов применяли средние значения. Данные выражены в виде среднего значения $\pm$ SEM. В исследованиях, в которых применяли две группы, для статистического сравнения применяли t-критерий Стьюдента. Для сравнений более двух групп применяли однофакторный ANOVA, а затем апостериорный критерий множественного сравнения Тьюки (Prism GraphPad). $p < 0,05$ считали соответствующим статистически значимому различию.

Результаты.

Как описано выше, в эксперименте 1 мышам дикого типа вводили путем инъекции векторы AAV2-eGFP и AAV2HVKO-GFP (табл. 2). Всех животных умерщвляли через 30 дней после инъекции. Флуоресцентная микроскопия выявила, что векторы на основе как AAV2, так и AAV2HVKO управляли экспрессией трансгена GFP в трансдуцированных нейронах (фиг. 9A и 9B). Экспрессия GFP была ограничена инъекционным каналом для AAV2 при минимальном распространении за пределы места инъекции (фиг. 9B). Однако, по сравнению с традиционным AAV2 AAV2HVKO управлял более стойкой и распространенной экспрессией GFP, при этом экспрессия наблюдалась далеко за пределами места инъекции (фиг. 9A). Эти результаты демонстрируют стойкую и обширную экспрессию трансгенов, доставляемых в CNS с помощью вектора на основе AAV2HVKO.

Пример 4. Сравнение опосредованной AAV2HVKO и AAV1 экспрессии GFP после интрастриарной инъекции в головные мозги мышей YAC128

Как описано выше, в эксперименте 2 мышам YAC128 вводили путем инъекции векторы серотипов AAV2HVKO и AAV1 (табл. 3). Эти векторы управляли экспрессией искусственной miRNA, нацеленной на НТТ человека, и репортерного GFP. Векторы на основе как AAV1, так и AAV2HVKO демонстрировали стойкое распределение GFP через 30 дней после инъекции в полосатое тело (фиг. 10A и 10B). Однако паттерн экспрессии GFP оказался весьма различающимся между двумя серотипами векторов. Экспрессия GFP в AAV1 (фиг. 10A) была более неравномерной и менее однородной, чем экспрессия GFP в AAV2HVKO (фиг. 10B). Трансдукция вектором в головных мозгах, обработанных AAV2HVKO, по-видимому, происходила исключительно в нейронах по сравнению с наблюдаемой для серотипов AAV1, которые трансдуцировали как нейроны, так и глиальные клетки, преимущественно астроциты. Эти результаты демонстрируют, что AAV2HVKO проявлял весьма отличающийся профиль экспрессии и трансдукции по сравнению с традиционным AAV1.

Пример 5. Инъекция AAV2HVKO-miRNA-Htt мышам YAC128 приводит к снижению уровня мРНК НТТ.

Далее оценивали способность векторов серотипов AAV1 и AAV2HVKO к экспрессии miRNA, осуществляющей сайленсинг экспрессии НТТ в полосатом теле мышей YAC128. Взрослые мыши YAC128 получали двусторонние интрастриарные инъекции AAV2/1-miRNA-Htt или AAV2HVKO-miRNA-Htt, и головные мозги анализировали через 30 дней после обработки. Уровни мРНК мутантного НТТ человека в полосатом теле были значительно снижены у мышей, которым вводили путем инъекции AAV2/1-

miRNA-Htt и AAV2HBKO-miRNA-Htt, по сравнению с необработанными контролями (фиг. 11A). Вестерн-блот-анализ биоптатов коры головного мозга продемонстрировал тенденцию к снижению уровня Htt в обеих группах обработки; тем не менее, изменчивость в необработанных контрольных образцах не позволила данным достичь статистической значимости (фиг. 11B). Эти результаты демонстрируют эффективность нокдауна генов с помощью RNAi при применении векторов на основе AAV1 и AAV2HBKO.

Пример 6. Инъекция AAV2HBKO-miRNA-Htt мышам YAC128 не вызывает нейровоспаление.

Для определения того, приводят ли инъекции AAV к нейровоспалению, изучали уровни маркеров нейровоспаления глиофибрилярного кислого белка (GFAP, астроцитарного маркера) и Iba1 (микроглиального маркера) через 30 дней после обработки. После обработки с помощью AAV2HBKO не наблюдали заметных повышений уровней Iba1 по сравнению с необработанными головными мозгами (сравн. фиг. 12A и 12B). Обработка с помощью AAV2/1, однако, вызывала повышение уровней Iba1 в месте инъекции (фиг. 12C), не наблюдавшееся ранее. Ни в одном из обработанных головных мозгов не наблюдали заметных повышений уровней GFAP через 30 дней после инъекции по сравнению с необработанными контролями (фиг. 13A-13C). Эти результаты указывают на то, что AAV2HBKO был способен управлять экспрессией miRNA, направленной на HTT человека, и вызывать снижение уровня HTT в отсутствие активации микроглии по сравнению с серотипом AAV1.

Выводы.

Существующие серотипы векторов на основе AAV проявляют ограниченное распределение в головном мозге после введения в один участок (например, Christine, C.W. et al. (2009) *Neurology* 73:1662-1669; Mandel, R.J. (2010) *Curr. Opin. Mol. Ther.* 12:240-247). Как подробно обсуждается в данном документе, авторы настоящего изобретения обнаружили, что введение векторов на основе AAV с ослабленным связыванием с гепарансульфатсодержащими протеогликанами (HSPG) на клеточных поверхностях усиливает опосредованную AAV трансдукцию в CNS. Эти результаты демонстрируют полезность AAV с модифицированным связыванием с HSPG для генной терапии в CNS, где желательна обширная распределение векторов. Кроме того, авторы настоящего изобретения также обнаружили, что векторы на основе AAV2 с ослабленным связыванием с HSPG характеризуются превосходным профилем безопасности (поскольку они нацелены исключительно на нейроны), достигая при этом широкой и стойкой эффективности трансдукции. Такие векторы поэтому являются применимыми для показаний со стороны CNS, при которых требуется обширная трансдукция нейронов в результате интрапаренхиматозной доставки.

Пример 7. Трансдукция *in vitro* и субретинальная трансдукция векторами на основе мутантных AAVrh8R и AAVrh8R.

Способы.

Конструирование плазмид на основе AAVrh8R с аргининовыми модификациями.

Плазмиду, несущую *rep/cap* AAVrh8R, подвергли мутации с помощью набора Quikchange Lightning Multi Site Directed Mutagenesis (Agilent Technologies). Для введения изменений аланина 586 на аргинин (AAVrh8R-A586R) или аргинина 533 на аланин (AAVrh8R-R533A) был сконструирован праймер для мутагенеза с помощью ПЦР. Положительные мутантные формы подтверждали путем секвенирования.

Создание векторов на основе gAAV.

Рекомбинантные векторы на основе AAV, экспрессирующие улучшенный зеленый флуоресцентный белок (EGFP) либо растворимый гибридный рецептор VEGF (sFLT02), получали путем тройной трансфекции клеток 293 с применением плазмид pAAVrh8R, pAAVrh8R-A586R или pAAVrh8R-R533A, несущих *rep/cap*, и плазмиды-помощника pAd. Трансгены находились под контролем промотора β -актина курицы (CBA).

Анализ трансдукции *in vitro*.

Клетки HeLa, HeLaRC32 или NS1 высевали в 24-луночные планшеты ($1-2 \times 10^5$ клеток на лунку). Через 24 ч после высевания клетки инфицировали 1×10^4 vg/клетка - 1×10^5 vg/клетка (+) Ad5ts149. Эффективность трансдукции измеряли через 48 ч после инфицирования по флуоресценции EGFP либо с помощью ELISA для количественной оценки sFLT02 в среде (ELISA для растворимого VEGFR1 человека от R&D Systems).

Животные.

Взрослых мышей C57BL/6, которых получали от Jackson Laboratories (Бар-Харбор, Мэн), приобретали и содержали в виварии. Животным предоставляли свободный доступ к пище и воде в течение всего периода проведения исследования. Все процедуры проводили согласно протоколу, утвержденному Институциональным комитетом по уходу за животными и их использованию.

Субретинальная инъекция.

Индукцировали мидриаз и циклоплегию путем местного применения тропикамида (Alcon, Форт-Уэрт, Техас). Индуцировали и поддерживали оцепенение с помощью 3,5% изофлурана, вводимого в кислороде, доставляемом животному через дыхательный контур, при скорости 800 мл/минута. Глаз обезбоживали при помощи щипцов с кольцеобразными кончиками (World Precision Instruments, Сарасота, Флорида) и пробный надрез выполняли примерно на 2 мм ниже лимба роговицы в склере при помощи иглы 30 калибра. Тупоконечную иглу 33 калибра направляли через надрез и продвигали кзади до про-

никновения кончика в заднюю нейросенсорную часть сетчатки. Один микролитр тестируемого препарата доставляли в течение 1 с. Иглу удерживали в рабочем положении в течение примерно 5 с перед извлечением. Животному давали возможность восстановиться после анестезии до возвращения его в клетку.

Количественная оценка sFLT02 в лизатах сетчатки.

Уровень sFLT02 в лизатах сетчатки мышей измеряли с применением набора для ELISA растворимого VEGFR1 человека от R&D Systems.

Результаты.

Для исследования роли аргининовых остатков на поверхности капсида в опосредованной AAVrh8 трансдукции в сетчатке создавали векторы на основе AAVrh8 с капсидными белками, несущими мутации в остатках, соответствующих аргининовым остаткам AAV2, участвующим в связывании с HSPG. На фиг. 14 сравниваются пять остатков капсида, критически важных для связывания AAV2 с HSPG, с соответствующими остатками в AAVrh8R. Как показано на фиг. 15, были сконструированы две мутантные формы AAVrh8R, каждая из которых несла аминокислотную замену этих остатков: A586R и R533A (ну-мерация приведена по аминокислотной последовательности VP1).

Для оценивания эффекта добавления аргининовых остатков в капсид AAVrh8R в отношении трансдукции *in vitro* клетки HeLa инфицировали вектором AAVrh8R-sFLT02 либо модифицированным вектором AAVrh8R-A586R-sFLT02, имеющим аргинин, добавленный в положение A586 (AAVrh8R A586R), в обоих случаях при 1×10^4 DRP/клетка. Через 48 ч после инфицирования эффективность трансдукции оценивали путем измерения уровня sFLT02 в среде для культивирования клеток. AAVrh8R-A586R характеризовался в несколько раз более высокой трансдукцией по сравнению с немодифицированным AAVrh8R (фиг. 16A).

Для оценивания эффекта удаления аргининовых остатков капсида в отношении трансдукции *in vitro* клетки HeLaRC32 инфицировали вектором AAVrh8R либо AAVrh8R-R533A (в обоих случаях при 1×10^4 DRP/клетка). AAVrh8R-R533A характеризовался значительно сниженной трансдукцией по сравнению с AAVrh8R (фиг. 16B).

Аналогичные эксперименты проводили с применением экспрессии EGFP в качестве меры эффективности трансдукции. AAVrh8R-A586R-EGFP характеризовался существенно улучшенной трансдукцией клеток NS1 по сравнению с AAVrh8R (сравн. фиг. 17B с фиг. 17A). Но в то же время вектор AAVrh8R-R533A-EGFP характеризовался сниженной трансдукцией клеток HeLa по сравнению с AAVrh8R (сравн. фиг. 17D с фиг. 17C).

В совокупности эти эксперименты позволяют предположить, что добавление аргининовых остатков в капсид AAVrh8R улучшает опосредованную AAVrh8R трансдукцию *in vitro*, тогда как удаление аргининовых остатков из капсида AAVrh8R ухудшает трансдукцию *in vitro*. Эти результаты демонстрируют, что на трансдукцию *in vitro*, опосредованную AAVrh8R, значительно влияют аргининовые остатки в капсиде.

Для определения эффекта аргининовых остатков в отношении опосредованной AAVrh8R субретинальной трансдукции мышам C57B16 вводили путем инъекции 1×10^8 DRP AAVrh8R, AAVrh8R-A586R или AAVrh8R-R533A, экспрессирующих sFLT02 под контролем промотора CBA. Мышей умерщвляли через 30 дней после введения вектора и в лизатах сетчатки измеряли уровень sFLT02.

Опосредованная AAVrh8R-A586R трансдукция в сетчатке мышей была существенно снижена по сравнению с AAVrh8R и фактически была сравнима с таковой для AAV2, который также имеет аргинин в том же самом положении R585 (фиг. 18A). Опосредованная AAVrh8R-R533A трансдукция в сетчатке мышей была улучшена по сравнению с AAVrh8R (фиг. 18B).

Эти данные наглядно свидетельствуют о влиянии аргининовых остатков капсида на субретинальную трансдукцию, опосредованную AAVrh8R, и позволяют предположить, что субретинальная трансдукция улучшается посредством удаления аргининовых остатков из капсида AAVrh8R. Эти результаты демонстрируют, что на субретинальную трансдукцию, опосредованную AAVrh8R, значительно влияют аргининовые остатки в капсиде.

Пример 8. Интравитреальная трансдукция, опосредованная AAVrh8R, улучшается посредством добавления аргинина в положение 586.

Способы.

Интравитреальная инъекция.

Индукцировали и поддерживали оцепенение с помощью 3,5% изофлурана, вводимого в кислороде, доставляемом животному через дыхательный контур, при скорости 800 мл/минута. Один микролитр тестируемого препарата вводили путем инъекции в жидкую часть стекловидного тела при помощи шприца от Hamilton, оснащенного скошенной иглой 33 калибра (Hamilton Co., Рино, Невада). Иглу направляли через склеру примерно на 2 мм ниже лимба роговицы и осторожно продвигали в стекловидную камеру во избежание контакта с хрусталиком. Тестируемый препарат доставляли в течение периода 1-2 с. После инъекции иглу удерживали в рабочем положении в течение примерно 5 с до извлечения. Животному давали возможность восстановиться после анестезии до возвращения его в клетку.

Количественная оценка sFLT02 в лизатах сетчатки.

Уровень sFLT02 в лизатах сетчатки мышей измеряли с применением набора для ELISA растворимого VEGFR1 человека от R&D Systems.

Результаты.

Для оценивания эффекта добавления аргининовых остатков в капсид AAV в отношении интравитреальной трансдукции мышам C57B16 вводили путем инъекции 1×10^9 DRP AAV2, AAVrh8R или AAVrh8R-A586R, каждый из которых нес конструкцию, экспрессирующую sFLT02 под контролем промотора CBA. Мышей умерщвляли через 30 дней после введения вектора и в лизатах сетчатки измеряли уровень sFLT02. Опосредованная AAVrh8R-A586R трансдукция в сетчатке мышей была улучшена по сравнению с AAVrh8R и фактически была сравнима с таковой для AAV2, который также имеет аргинин в том же самом положении R585 (фиг. 19). Эти данные указывают на то, что интравитреальную трансдукцию в сетчатке можно улучшить путем добавления аргининовых остатков в капсид AAV. Как следует из этих результатов и гомологии последовательностей между капсидами AAV (фиг. 20), посредством интравитреальной трансдукции в сетчатке частицами AAV, несущими капсиды AAV1, AAV6, AAV8, AAV9 и AAVrh10, можно аналогичным образом улучшить трансдукцию в сетчатке.

Последовательности

Все полипептидные последовательности представлены в направлении от N-конца к C-концу, если не указано иначе.

Все последовательности нуклеиновых кислот представлены в направлении от 5'-конца к 3'-концу, если не указано иначе.

Аминокислотная последовательность VP1 AAV2

MAADGYLPDWLEDTLSEGIQWWKLKPGPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLGPFGNLDKGEPVNEAD
AAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADAEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLLEPLGLVEEPVKT
APGKKRPVEHSPVEPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDADSVDPQPLGQPPAAPSGLGTNTMATGSG
APMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYS
TPWGYDFNRFHCHFSRDPWQRLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLSTVQVFTDSE
YQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFED
VPFHSSYAHQSGLDRLMNPLIDQYLYLSRTNTPSGTTTQSRQLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRV
SKTSADNNNSEYSWTGATKYHLNGRDSL VNPGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTNVDIEKVM
ITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNLQRGNRQAATADVNTQGVLPGMVWQDRDVYLQGGPIWAKIPHTDGHF
HPSPLMGGFGLKHPPQILIKNTVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYT
SNYNKSVNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL (SEQ ID NO:1)

Аминокислотная последовательность VP1 AAV2 HBKO

MAADGYLPDWLEDTLSEGIQWWKLKPGPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLGPFGNLDKGEPVNEAD
AAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADAEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLLEPLGLVEEPVKT
APGKKRPVEHSPVEPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDADSVDPQPLGQPPAAPSGLGTNTMATGSG
APMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYS
TPWGYDFNRFHCHFSRDPWQRLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLSTVQVFTDSE
YQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFED
VPFHSSYAHQSGLDRLMNPLIDQYLYLSRTNTPSGTTTQSRQLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRV
SKTSADNNNSEYSWTGATKYHLNGRDSL VNPGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTNVDIEKVM
ITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNLQAGNAQAATADVNTQGVLPGMVWQDRDVYLQGGPIWAKIPHTDGHF
HPSPLMGGFGLKHPPQILIKNTVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYT
SNYNKSVNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL (SEQ ID NO:2)

Аминокислотная последовательность VP2 AAV2

MAPGKKRPVEHSPVEPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDADSVDPQPLGQPPAAPSGLGTNTMATGS
GAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGY
STPWGYDFNRFHCHFSRDPWQRLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLSTVQVFTDS
EYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFED
VPFHSSYAHQSGLDRLMNPLIDQYLYLSRTNTPSGTTTQSRQLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRV
SKTSADNNNSEYSWTGATKYHLNGRDSL VNPGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTNVDIEKVM
ITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNLQRGNRQAATADVNTQGVLPGMVWQDRDVYLQGGPIWAKIPHTDGHF
HPSPLMGGFGLKHPPQILIKNTVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYT
SNYNKSVNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL (SEQ ID NO:3)

Аминокислотная последовательность VP2 AAV2 HBKO

MAPGKKRPVEHSPVEPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDADSVDPQPLGQPPAAPSGLGTNTMATGS
GAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGY
STPWGYDFNRFHCHFSRDPWQRLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLSTVQVFTDS
EYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFED

VPFHSSY AHSQSLDRLMNPLIDQYLYL SRTNTPSGTTTQSRLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRV
SKTSADNNNSEYSWTGATKYHLNGRDSL VNP GPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTNVDIEKVM
ITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNLQAGNAQAATADVNTQGVLPGMVWQDRDVYLQGPWAKIPHTDGHF
HPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYT
SNYNKSVNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL (SEQ ID NO:4)

Аминокислотная последовательность VP3 AAV2

MATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDN
HYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSRDLWQRLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTV
QVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVMPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFT
FSYTFEDVPFHSSY AHSQSLDRLMNPLIDQYLYL SRTNTPSGTTTQSRLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPC
YRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGATKYHLNGRDSL VNP GPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTN
VDIEKVMITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNLQAGNRQAATADVNTQGVLPGMVWQDRDVYLQGPWAKI
PHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRW
NPEIQYTSNYNKSVNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL (SEQ ID NO:5)

Аминокислотная последовательность VP3 AAV2 HBKO

MATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDN
HYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSRDLWQRLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTV
QVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVMPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFT
FSYTFEDVPFHSSY AHSQSLDRLMNPLIDQYLYL SRTNTPSGTTTQSRLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPC
YRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGATKYHLNGRDSL VNP GPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTN
VDIEKVMITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNLQAGNAQAATADVNTQGVLPGMVWQDRDVYLQGPWAKI
PHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRW
NPEIQYTSNYNKSVNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL (SEQ ID NO:6)

Аминокислотная последовательность VP1 AAV3

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGVPOPKANQQHQDNRRGLVLPGYKYLGPGNGLDKGEPVNE
ADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADA EFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRILEPLGLVEEA
AKTAPGKKRPVDQSPQEPDSSSGVGKSGKQ PARKRLNFGQTGDSESVDPDQPLGEPPAAPTSLGSNTMAS
GGGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSQWL GDRVITSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHY
FGYSTPWGYFDFNRFHCHFSRDLWQRLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTVQ
VFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVMPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQ
FSYTFEDVPFHSSY AHSQSLDRLMNPLIDQYLYL NRTQGTSGTTNQSRLFSQAGPQSMQLQARNWLP
GPCYRQRLSKTANDNNNSNFPWTAASKYHLNGRDSL VNP GPAMASHKDDEEKFFPMHGNLIFGKEGT
TASNAELDNVMITDEEEIRTTNPVATEQYGTVANLQSSNTAPTTRTVNDQGALPGMVWQDRDVYLQ
PIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQIMIKNTVPANPPTTFSAPKASFITQYSTGQVSVEIEWELQ
KENS KRWNPEIQYTSNYNKSVNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL (SEQ ID NO:7)

Мутантный ITR для векторов на основе scAAV

CACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCACGCCCCGGGCT
TTGCCCGGGCG (SEQ ID NO:8)

Аминокислотная последовательность VP1 AAVrh8R

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEPVNA
ADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADA EFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRILEPLGLVEEA
GAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSSGIGKTGQQA KKRRLNFGQTGDSESVDPDQPLGEPPAAPSGLGPNTMA
SGGGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWL GDRVITSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGSTND
NTYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSRDLWQRLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTNEGKTIANNLTST
VQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVMPQYGYLTLNNGSQALGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNN
FQFSYTFEDVPFHSSY AHSQSLDRLMNPLIDQYLYL VRTQTGTGGTQTLAFSQAGPSSMANQARNWW

PGPCYRQQRVSTTTNQNNSNFAWTGAAKFKLNGRDSLMPGVAMASHKDDERFFPSSGVLIFGKQG
AGNDGVDYSQVLITDEEEIKATNPVATEEYGAVAINNQAANTQAQTGLVHNQGVIPGMVWQNRDVYL
QGPIWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTVPADPPLTFNQAKLNSFITQYSTGQVSVEIEWE
LQKENS KRWNPEIQYTSNYKSTNVDFAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL (SEQ ID NO:9)

Аминокислотная последовательность VP1 AAVrh8R с мутацией A586R

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEPVNA
ADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLLEPLGLVEE
GAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSSGIGKTGQQPAKKRLNFGQTGDSESVDPQPLGEPPAAPSGLGPNTMA
SGGGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWLGDRTVTTSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGSTND
NTYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSRDPWQRLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTTNEGKTIANNLTST
VQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQALGRSSFYCLEYFSPQMLRTGNN
FQFSYTFEDVPFHSSY AHSQSLDRLMNPLIDQYLYLVRTQTTGTGGTQTLAFSQAGPSSMANQARNWV
PGPCYRQQRVSTTTNQNNSNFAWTGAAKFKLNGRDSLMPGVAMASHKDDERFFPSSGVLIFGKQG
AGNDGVDYSQVLITDEEEIKATNPVATEEYGAVAINNQANTQAQTGLVHNQGVIPGMVWQNRDVYLQ
GPIWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTVPADPPLTFNQAKLNSFITQYSTGQVSVEIEWEL
QKENS KRWNPEIQYTSNYKSTNVDFAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL (SEQ ID NO:10)

Аминокислотная последовательность VP1 AAVrh8R с мутацией R533A

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEPVNA
ADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLLEPLGLVEE
GAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSSGIGKTGQQPAKKRLNFGQTGDSESVDPQPLGEPPAAPSGLGPNTMA
SGGGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWLGDRTVTTSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGSTND
NTYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSRDPWQRLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTTNEGKTIANNLTST
VQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQALGRSSFYCLEYFSPQMLRTGNN
FQFSYTFEDVPFHSSY AHSQSLDRLMNPLIDQYLYLVRTQTTGTGGTQTLAFSQAGPSSMANQARNWV
PGPCYRQQRVSTTTNQNNSNFAWTGAAKFKLNGRDSLMPGVAMASHKDDERFFPSSGVLIFGKQG
AGNDGVDYSQVLITDEEEIKATNPVATEEYGAVAINNQAANTQAQTGLVHNQGVIPGMVWQNRDVYL
QGPIWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTVPADPPLTFNQAKLNSFITQYSTGQVSVEIEWE
LQKENS KRWNPEIQYTSNYKSTNVDFAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL (SEQ ID NO:11)

Аминокислотная последовательность VP1 AAV1

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFNGLD
KGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQ
AKKRVLLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSSGIGKTGQQPAKKRLNFGQTGDSE
SVDPQPLGEPPATPAAVGPTTMASSGGAPMADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDRTVI
TTSTRTWALPTYNNHLYKQISSASTGASNDNHYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSRDPWQRL
INNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTTNDGVTIANNLTSTVQVFSSEYQLPYVLGSAHQ
GCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFSPQMLRTGNNFTFSYTFEEVP
FHSSY AHSQSLDRLMNPLIDQYLYLNRNQSGSAQNKDLLFSRGPAGMSVQPKNWLP
GPCYRQQRVSKTKTDNNNSNFTWTGASKYNLNGRESINPGTAMASHKDDERKFFPMSGV
MIFGKESAGASNTALDNVMITDEEEIKATNPVATERFGTVAVNFQSSSTDPATGDVHAMG
ALPGMVWQDRDVYLQGPWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKNPPPQILIKNTVPANPPA
EFSATKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEVQYTSNYAKSANVDFTVDNNGL
YTEPRPIGTRYLTRPL (SEQ ID NO:12)

Аминокислотная последовательность VP1 AAV6

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFNGLD

KGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQ
 AKKRVLPEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSSGIGKGTGQPAKKRLNFGQTGDSE
 SVPDPQPLGEPPATPAAVGPTTMASSGGAPMADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDRVI
 TTSTRTWALPTYNNHLYKQISSASTGASNDNHYFGYSTPWGYDFNRFHCHFSRWDQRL
 INNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTNDGVTIANNLSTVQVFSQSEYQLPYVLGSAHQ
 GCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVP
 FHSSYAHQSGLDRLMNPLIDQYLYLNRQTQNSGSAQNKDLLFSRGSAPAGMSVQPKNWLP
 GPCYRQQRVSKTKTDNNNSNFTWTGASKYNLNGRESIINPGTAMASHKDDKDKFFPMSGV
 MIFGKESAGASNTALDNVMITDEEEIKATNPVATERFGTVAVNLQSSSTDPATGDVHVMG
 ALPGMVWQDRDVYLQGPWAKIPHTDGNFHPSPMLMGGFGLKHPPQILIKNTVPANPPA
 EFSATKFASTIYQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEVQYTSNYAKSANVDFTVDNNGL
 YTEPRPIGTRYLTRPL (SEQ ID NO:13)

Аминокислотная последовательность VP1 AAV8

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFGNGLD
 KGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQ
 AKKRVLPEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEQSPQSPDSSSTGIGKKGQPAKKRLNFGQTGDS
 ESVPDPQPLGEPPAAPSGVGPTMAAGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGDRVI
 ITTSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGATNDNTYFGYSTPWGYDFNRFHCHFSRWDQ
 RLINNNWGFPRKRLSFKLFNIQVKEVTQNEGKTIANNLTSTIQVFTDSEYQLPYVLGSA
 HQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFTYTFED
 VPFHSSYAHQSGLDRLMNPLIDQYLYLRSRTQTGGTANTQTLGFSQGGPNTMANQAKNW
 LPGPCYRQQRVSTTTGQNNNSNFAWTAGTKYHLNGRNSLANPGIAMATHKDDDEERFFPSN
 GILIFGKQNAARDNADYSDVMLTSEEEIKTTNPVATEEYGIVADNLQQQNTAPQIGTVNS
 QGALPGMVWQNRDVYLQGPWAKIPHTDGNFHPSPMLMGGFGLKHPPQILIKNTVPADP
 PTTFNQSKLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYYKSTSVDFAVNTE
 GVVYSEPRPIGTRYLTRNL (SEQ ID NO:14)

Аминокислотная последовательность VP1 AAV9

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLGPFGNGLD
 KGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADADEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQ
 AKKRLLPEPLGLVEEAATAAPGKKRPVEQSPQEPDSSAGIGKSGAQAQPAKKRLNFGQTGDTE
 SVPDPQPIGEPPAAPSGVGSGLTMASSGGAPVADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGDRVI
 TTSTRTWALPTYNNHLYKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTPWGYDFNRFHCHFSRWDQRL
 LINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTDNNGVKTIANNLTSTVQVFTDSQYQLPYVLGSAH
 EGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNDGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYEFENV
 PPHSSYAHQSGLDRLMNPLIDQYLYLSKTINGSGQNQQTLKFSVAGPSNMAVQGRNYP
 GPSYRQQRVSTTVTQNNNSEFAWPGASSWALNGRNSLMNPGPAMASHKEGEDRFFPLSGS
 LIFGKQGTGRDNVDADKVMITNEEEIKTTNPVATESYGVATNHQSAQAQAQTGWVQNGQ
 ILPGMVWQDRDVYLQGPWAKIPHTDGNFHPSPMLMGGFGMKHPPQILIKNTVPADPPT
 AFNKDKLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYYKSNNVEFAVNTEGV
 YSEPRPIGTRYLTRNL (SEQ ID NO:15)

Аминокислотная последовательность VP1 AAVrh10

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFGNGLD
 KGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQ
 AKKRVLPEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEQSPQSPDSSSTGIGKKGQPAKKRLNFGQTGDS
 ESVPDPQPIGEPPAGPSGLSGTMAAGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGDRVI
 ITTSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGSTNDNTYFGYSTPWGYDFNRFHCHFSRWDQRL
 RLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTQNEGKTIANNLTSTIQVFTDSEYQLPYVLGSA
 HQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFEFSYQFED
 VPFHSSYAHQSGLDRLMNPLIDQYLYLRSRTQSTGGTAGTQQLFSQAGPNNMSAQAKNW
 LPGPCYRQQRVSTTSLQNNNSNFAWTGATKYHLNGRDSL VNPVAMATHKDDDEERFFPS
 GVLNMFQKQAGKDNVDYSSVMLTSEEEIKTTNPVATEQYGVVADNLQQQNAAPIVGAVNS
 QGALPGMVWQNRDVYLQGPWAKIPHTDGNFHPSPMLMGGFGLKHPPQILIKNTVPADP
 PTTFSQAKLASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYYKSTNVDFAVNTD
 GTYSEPRPIGTRYLTRNL (SEQ ID NO:16)

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ доставки гетерологичной нуклеиновой кислоты в глаз индивидуума, включающий введение частицы рекомбинантного аденоассоциированного вируса (гAAV) в субретинальную область индивидуума, где частица гAAV содержит:

а) капсид гAAV, содержащий капсидные белки гAAV, содержащие одну или несколько аминокислотных замен в одном или нескольких положениях, соответствующих аминокислотам 484, 487, 527, 532, 585 или 588, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAV2, где одна или несколько аминокислотных замен включают замену положительно заряженного аминокислотного остатка гидрофобным аминокислотным остатком, и

б) вектор на основе гAAV, содержащий гетерологичную нуклеиновую кислоту и по меньшей мере один инвертированный концевой повтор AAV.

2. Способ улучшения трансдукции клеток, опосредованной гAAV, или улучшения экспрессии гетерологичной нуклеиновой кислоты после субретинальной доставки частицы гAAV в глаз индивидуума по сравнению с трансдукцией клеток, опосредованной гAAV, содержащим капсид дикого типа, при этом способ включает внедрение одной или нескольких аминокислотных замен в капсидный белок AAV в одно или несколько положений, соответствующих аминокислотам 484, 487, 527, 532, 585 или 588, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAV2, где одна или несколько аминокислотных замен включают замену положительно заряженного аминокислотного остатка гидрофобным аминокислотным остатком; где частица гAAV содержит капсидный белок гAAV и вектор на основе гAAV, содержащий гетерологичную нуклеиновую кислоту и по меньшей мере один концевой повтор AAV.

3. Способ лечения глазного нарушения у индивидуума, включающий доставку композиции, содержащей частицу гAAV, в сетчатку индивидуума, где частицы гAAV содержат:

а) капсид гAAV, содержащий капсидный белок гAAV, содержащий одну или несколько аминокислотных замен в одном или нескольких положениях, соответствующих аминокислотам 484, 487, 527, 532, 585 или 588, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAV2, где одна или несколько аминокислотных замен включают замену положительно заряженного аминокислотного остатка гидрофобным аминокислотным остатком, и

б) вектор на основе гAAV, содержащий гетерологичную нуклеиновую кислоту и по меньшей мере один концевой повтор AAV.

4. Способ по любому из пп. 1-3, где одна или несколько аминокислотных замен ослабляют связывание частицы гAAV с гепарансульфатсодержащим протеогликаном.

5. Система для субретинальной доставки вектора в глаз индивидуума, содержащая:

а) композицию, содержащую эффективное количество частиц гAAV, где:

i) капсидный белок частиц гAAV содержит одну или несколько аминокислотных замен в одном или нескольких положениях, соответствующих аминокислотам 484, 487, 527, 532, 585 или 588, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAV2, где одна или несколько аминокислотных замен включают замену положительно заряженного аминокислотного остатка гидрофобным аминокислотным остатком, и

ii) вектор содержит гетерологичную нуклеиновую кислоту, кодирующую терапевтический полипептид или терапевтическую РНК, и по меньшей мере один концевой повтор AAV; и

б) устройство для субретинальной доставки гAAV.

6. Набор для лечения глазного нарушения, содержащий:

а) композицию, содержащую частицы гAAV, где частица гAAV содержит:

i) капсид гAAV, содержащий капсидные белки гAAV, содержащие одну или несколько аминокислотных замен в одном или нескольких положениях, соответствующих аминокислотам 484, 487, 532, 585 или 588, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAV2, где одна или несколько аминокислотных замен включают замену положительно заряженного аминокислотного остатка гидрофобным аминокислотным остатком, и

ii) вектор на основе гAAV, содержащий гетерологичную нуклеиновую кислоту для лечения глазного нарушения и по меньшей мере один инвертированный концевой повтор AAV; и

б) фармацевтический наполнитель, подходящий для субретинального введения.

7. Способ доставки гетерологичной нуклеиновой кислоты в центральную нервную систему (CNS) индивидуума, включающий введение частицы рекомбинантного аденоассоциированного вируса (гAAV) в CNS индивидуума, где частица гAAV содержит:

а) капсид гAAV, содержащий капсидные белки гAAV, содержащие одну или несколько аминокислотных замен в одном или нескольких положениях, соответствующих аминокислотам 484, 487, 527, 532, 585 или 588, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAV2, где одна или несколько аминокислотных замен включают замену положительно заряженного аминокислотного остатка гидрофобным аминокислотным остатком, и

б) вектор на основе гAAV, содержащий гетерологичную нуклеиновую кислоту и по меньшей мере

один инвертированный концевой повтор AAV.

8. Способ улучшения трансдукции клеток, опосредованной гAAV, или улучшения экспрессии гетерологичной нуклеиновой кислоты в центральной нервной системе (CNS) индивидуума по сравнению с трансдукцией клеток, опосредованной гAAV, содержащим капсид дикого типа, при этом способ включает введение частицы рекомбинантного аденоассоциированного вируса (гAAV) в CNS индивидуума, где частица гAAV содержит:

а) капсид гAAV, содержащий капсидные белки гAAV, содержащие одну или несколько аминокислотных замен в одном или нескольких положениях, соответствующих аминокислотам 484, 487, 527, 532, 585 или 588, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAV2, где одна или несколько аминокислотных замен включают замену положительно заряженного аминокислотного остатка гидрофобным аминокислотным остатком, и

б) вектор на основе гAAV, содержащий гетерологичную нуклеиновую кислоту и по меньшей мере один инвертированный концевой повтор AAV.

9. Способ лечения нарушения со стороны центральной нервной системы (CNS) индивидуума, включающий введение эффективного количества композиции, содержащей частицу гAAV, в CNS индивидуума, где частица гAAV содержит:

а) капсид гAAV, содержащий капсидный белок гAAV, содержащий одну или несколько аминокислотных замен в одном или нескольких положениях, соответствующих аминокислотам 484, 487, 527, 532, 585 или 588, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAV2, где одна или несколько аминокислотных замен включают замену положительно заряженного аминокислотного остатка гидрофобным аминокислотным остатком, и

б) вектор на основе гAAV, содержащий гетерологичную нуклеиновую кислоту и по меньшей мере один концевой повтор AAV.

10. Способ лечения болезни Хантингтона или болезни Паркинсона у индивидуума, включающий введение эффективного количества композиции, содержащей частицу рекомбинантного аденоассоциированного вируса (гAAV), в полосатое тело индивидуума, где частица гAAV содержит:

а) капсид гAAV, содержащий капсидный белок гAAV, содержащий одну или несколько аминокислотных замен в одном или нескольких положениях, соответствующих аминокислотам 484, 487, 527, 532, 585 или 588, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAV2, где одна или несколько аминокислотных замен включают замену положительно заряженного аминокислотного остатка гидрофобным аминокислотным остатком, и

б) вектор на основе гAAV, содержащий гетерологичную нуклеиновую кислоту и по меньшей мере один концевой повтор AAV, где гетерологичная нуклеиновая кислота кодирует терапевтический полипептид или терапевтическую нуклеиновую кислоту.

11. Способ по любому из пп.7-10, где одна или несколько аминокислотных замен ослабляют связывание частицы гAAV с гепарансульфатсодержащим протеогликаном или повышают уровень трансдукции клеток в центральной нервной системе.

12. Набор для доставки гетерологичной нуклеиновой кислоты в центральную нервную систему (CNS) индивидуума, содержащий композицию, содержащую частицу рекомбинантного аденоассоциированного вируса (гAAV), где частица гAAV содержит:

а) капсид гAAV, содержащий капсидные белки гAAV, содержащие одну или несколько аминокислотных замен в одном или нескольких положениях, соответствующих аминокислотам 484, 487, 527, 532, 585 или 588, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAV2, где одна или несколько аминокислотных замен включают замену положительно заряженного аминокислотного остатка гидрофобным аминокислотным остатком, и

б) вектор на основе гAAV, содержащий гетерологичную нуклеиновую кислоту и по меньшей мере один инвертированный концевой повтор AAV.

13. Набор для лечения нарушения со стороны центральной нервной системы (CNS) у индивидуума, содержащий композицию, содержащую частицу рекомбинантного аденоассоциированного вируса (гAAV), где частица гAAV содержит:

а) капсид гAAV, содержащий капсидные белки гAAV, содержащие одну или несколько аминокислотных замен в одном или нескольких положениях, соответствующих аминокислотам 484, 487, 527, 532, 585 или 588, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAV2, где одна или несколько аминокислотных замен включают замену положительно заряженного аминокислотного остатка гидрофобным аминокислотным остатком, и

б) вектор на основе гAAV, содержащий гетерологичную нуклеиновую кислоту для лечения нарушения со стороны CNS и по меньшей мере один инвертированный концевой повтор AAV.

14. Частица рекомбинантного аденоассоциированного вируса (гAAV) для применения в способе по любому из пп.1-4 или 7-11.

15. Частица рекомбинантного аденоассоциированного вируса (гAAV) для лечения болезни Хантингтона или болезни Паркинсона у индивидуума, где частица гAAV содержит:

а) капсид гAAV, содержащий капсидный белок гAAV, содержащий одну или несколько аминокис-

лотных замен в одном или нескольких положениях, соответствующих аминокислотам 484, 487, 527, 532, 585 или 588, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAV2, где одна или несколько аминокислотных замен включают замену положительно заряженного аминокислотного остатка гидрофобным аминокислотным остатком, и

b) вектор на основе gAAV, содержащий гетерологичную нуклеиновую кислоту и по меньшей мере один концевой повтор AAV,

где частица gAAV составлена для доставки в полосатое тело и/или составлена для доставки в один участок.

16. Способ по любому из пп.1-4 и 7-11, где одна или несколько аминокислотных замен включают замену аргининового или лизинового остатка аланиновым остатком, необязательно, где:

(i) одна или несколько аминокислотных замен включают замену в положении R484, R487, K527 и/или K532, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAV2; и/или

(ii) одна или несколько аминокислотных замен включают замены R484A и R487A или замены R585A и R588A, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAV2; и/или

(iii) капсид AAV включает аминокислотную замену K532A, нумерация которой приведена согласно нумерации VP1 AAV2.

17. Способ по любому из пп.1-4, 7-11 и 16, где частица gAAV включает один или несколько капсидных белков gAAV, имеющих по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 91%, по меньшей мере приблизительно 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере приблизительно 94%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98%, по меньшей мере приблизительно 99% или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2, 4 или 6.

18. Способ по любому из пп.1-4, 7-11 или 16, 17, где:

(i) гетерологичная нуклеиновая кислота кодирует полипептид, выбранный из группы, состоящей из антиоксиданта, нейротрофического фактора, антиапоптозного фактора, антиангиогенного фактора и противовоспалительного фактора; и/или

(ii) гетерологичная нуклеиновая кислота кодирует терапевтическую нуклеиновую кислоту.

19. Способ по любому из пп.1-4, 7-11 или 16-18, где вектор на основе gAAV представляет собой самокомплементарный вектор на основе gAAV.

20. Частица gAAV, содержащая капсидный белок AAVrh8R, где капсидный белок AAVrh8R содержит одну или несколько аминокислотных замен в одном или нескольких положениях, соответствующих аминокислотам 484, 487, 527, 532, 585 или 588, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAV2, где одна или несколько аминокислотных замен включают замену положительно заряженного аминокислотного остатка гидрофобным аминокислотным остатком или где одна или несколько аминокислотных замен включают замену аминокислотного остатка, который не является положительно заряженным, положительно заряженным аминокислотным остатком.

21. Способ повышения эффективности трансдукции частицей gAAV, содержащей капсидный белок AAVrh8R, включающий введение одной или нескольких аминокислотных замен в капсидный белок в одном или нескольких положениях, соответствующих аминокислотам 484, 487, 527, 532, 585 или 588, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAV2, где одна или несколько аминокислотных замен включают замену положительно заряженного аминокислотного остатка гидрофобным аминокислотным остатком или где одна или несколько аминокислотных замен включают замену аминокислотного остатка, который не является положительно заряженным, положительно заряженным аминокислотным остатком, где одна или несколько аминокислотных замен повышают эффективность трансдукции клетки в глаз или центральной нервной системе частицей gAAV по сравнению с частицей AAV, содержащей капсидный белок AAVrh8R дикого типа.

22. Частица gAAV, содержащая капсидный белок AAV1, капсидный белок AAV6, капсидный белок AAV8, капсидный белок AAV9 или капсидный белок AAVrh10, где капсидный белок AAV1, капсидный белок AAV6, капсидный белок AAV8, капсидный белок AAV9 или капсидный белок AAVrh10 содержит одну или несколько аминокислотных замен в одном или нескольких положениях, соответствующих аминокислотам 484, 487, 527, 532, 585 или 588, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAV2, где одна или несколько аминокислотных замен включают замену положительно заряженного аминокислотного остатка гидрофобным аминокислотным остатком или где одна или несколько аминокислотных замен включают замену аминокислотного остатка, который не является положительно заряженным, положительно заряженным аминокислотным остатком.

23. Способ доставки гетерологичной нуклеиновой кислоты в сетчатку индивидуума, включающий интравитреальное введение частицы рекомбинантного аденоассоциированного вируса (gAAV) индивидууму, где частица gAAV содержит:

a) капсид gAAV, содержащий капсидные белки gAAV, содержащие одну или несколько аминокислотных замен в одном или нескольких положениях, соответствующих аминокислотам 484, 487, 527, 532, 585 или 588, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAV2, где одна или несколько аминокислотных замен включают замену положительно заряженного аминокислотного остатка гидро-

фобным аминокислотным остатком, и

б) вектор на основе гAAV, содержащий гетерологичную нуклеиновую кислоту и по меньшей мере один инвертированный концевой повтор AAV.

24. Способ улучшения трансдукции клеток, опосредованной гAAV, или улучшения экспрессии гетерологичной нуклеиновой кислоты после интравитреальной доставки частицы гAAV в глаз индивидуума по сравнению с трансдукцией клеток, опосредованной гAAV, содержащим капсид дикого типа, при этом способ включает внедрение одной или нескольких аминокислотных замен в капсидный белок AAV в одно или несколько положений, соответствующих аминокислотам 484, 487, 527, 532, 585 или 588, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAV2, где одна или несколько аминокислотных замен включают замену положительно заряженного аминокислотного остатка гидрофобным аминокислотным остатком; где частица гAAV содержит капсидный белок гAAV и вектор на основе гAAV, содержащий гетерологичную нуклеиновую кислоту и по меньшей мере один концевой повтор AAV.

25. Способ лечения глазного нарушения у индивидуума, включающий интравитреальную доставку композиции, содержащей частицы гAAV, в сетчатку индивидуума, где частицы гAAV содержат:

а) капсид гAAV, содержащий капсидный белок гAAV, содержащий одну или несколько аминокислотных замен в одном или нескольких положениях, соответствующих аминокислотам 484, 487, 527, 532, 585 или 588, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAV2, где одна или несколько аминокислотных замен включают замену положительно заряженного аминокислотного остатка гидрофобным аминокислотным остатком, и

б) вектор на основе гAAV, содержащий гетерологичную нуклеиновую кислоту и по меньшей мере один концевой повтор AAV.

26. Система для интравитреальной доставки вектора в глаз индивидуума, содержащая:

а) композицию, содержащую эффективное количество частиц гAAV, где:

i) капсидный белок частиц гAAV содержит одну или несколько аминокислотных замен в одном или нескольких положениях, соответствующих аминокислотам 484, 487, 527, 532, 585 или 588, где одна или несколько аминокислотных замен включают замену положительно заряженного аминокислотного остатка гидрофобным аминокислотным остатком, и

ii) вектор содержит гетерологичную нуклеиновую кислоту, кодирующую терапевтический полипептид или терапевтическую РНК, и по меньшей мере один концевой повтор AAV; и

б) устройство для интравитреальной доставки гAAV.

27. Набор для лечения глазного нарушения, содержащий:

а) композицию, содержащую частицы гAAV, где частица гAAV содержит:

i) капсид гAAV, содержащий капсидные белки гAAV, содержащие одну или несколько аминокислотных замен в одном или нескольких положениях, соответствующих аминокислотам 484, 487, 527, 532, 585 или 588, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAV2, где одна или несколько аминокислотных замен включают замену положительно заряженного аминокислотного остатка гидрофобным аминокислотным остатком, и

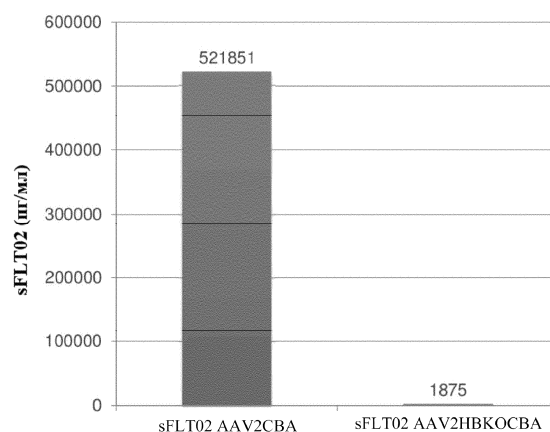
ii) вектор на основе гAAV, содержащий гетерологичную нуклеиновую кислоту для лечения глазного нарушения и по меньшей мере один инвертированный концевой повтор AAV; и

б) фармацевтический наполнитель, подходящий для интравитреального введения, где необязательно частица гAAV содержит капсид AAVrh8R, AAV1, AAV6, AAV8, AAV9 или AAVrh10.

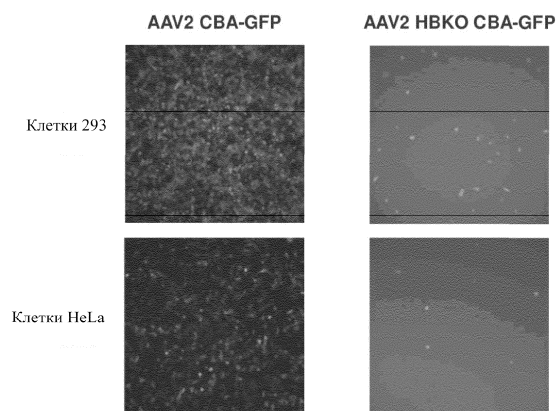
28. Способ по любому из пп.21 и 23-25, где одна или несколько аминокислотных замен включают замену аланинового, серинового, глутаминового или треонинового остатка аргининовым или лизинным остатком, необязательно, где одна или более аминокислотных замен находятся в положениях 586 и/или 589, нумерация которых приведена согласно нумерации VP1 AAVrh8R.

№ аминокислоты AAV2	484	487	532	585	588
AAV2	R	R	K	R	R
AAV2 HBKO	R	R	K	A	A

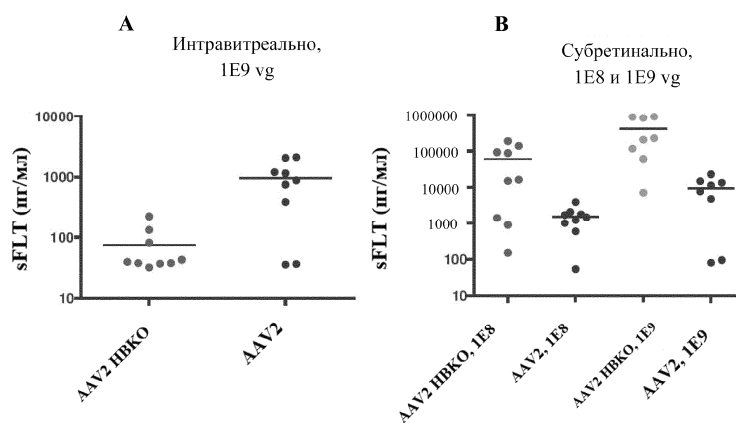
Фиг. 1



Фиг. 2

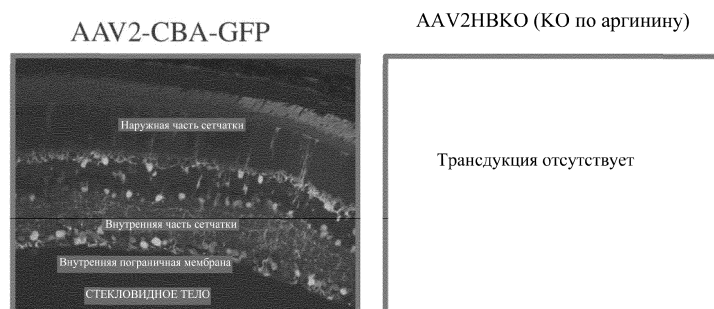


Фиг. 3

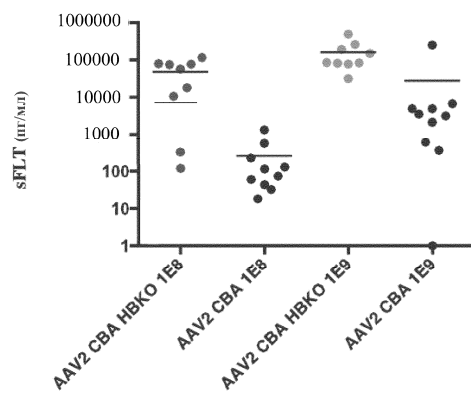


Фиг. 4

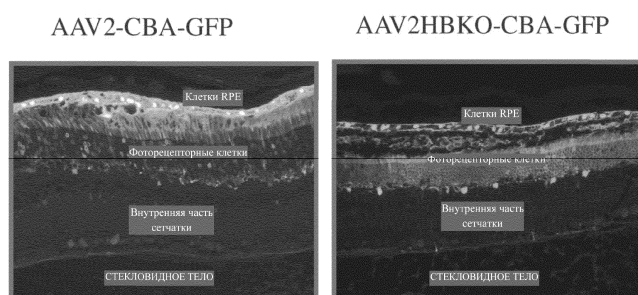
Мутации по аргинину приводят к снижению уровня опосредованной AAV2 интравитреальной трансдукции в глазу мыши



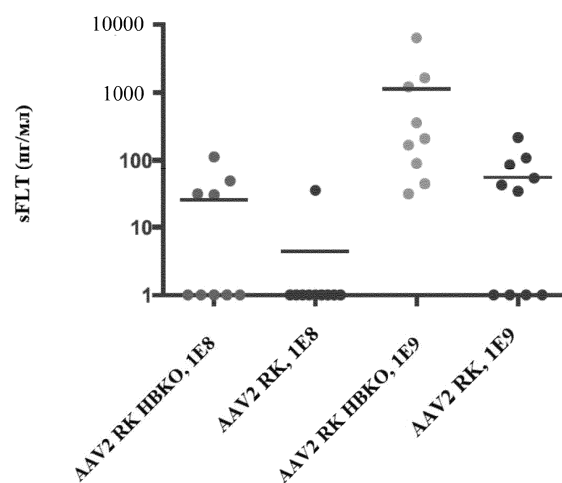
Фиг. 5



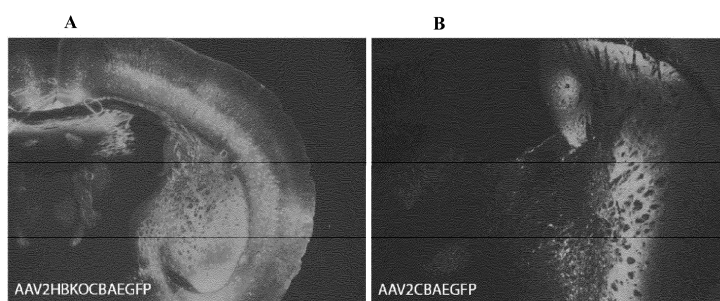
Фиг. 6



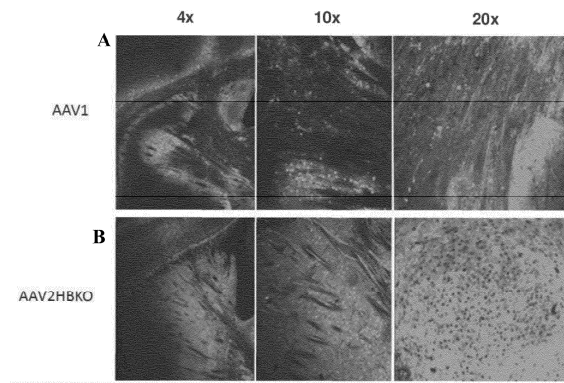
Фиг. 7



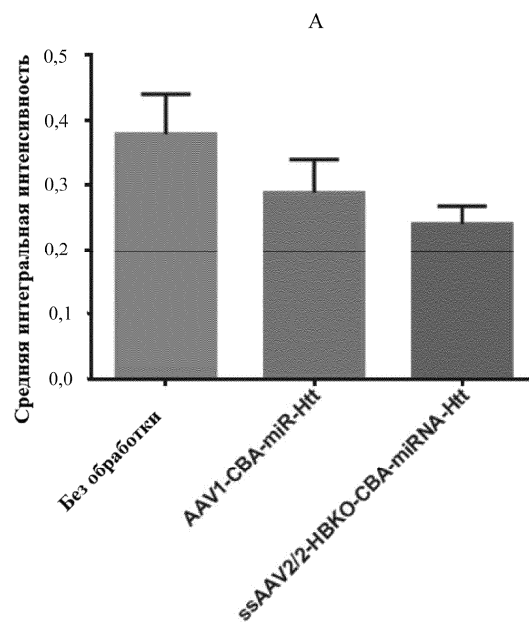
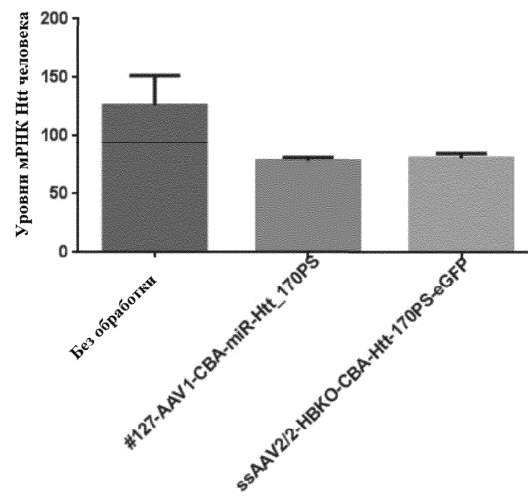
Фиг. 8



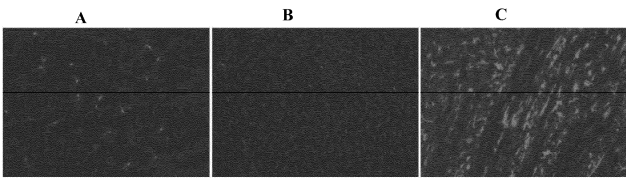
Фиг. 9



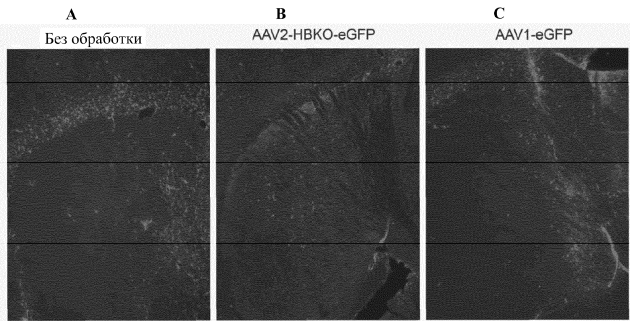
Фиг. 10



Фиг. 11



Фиг. 12



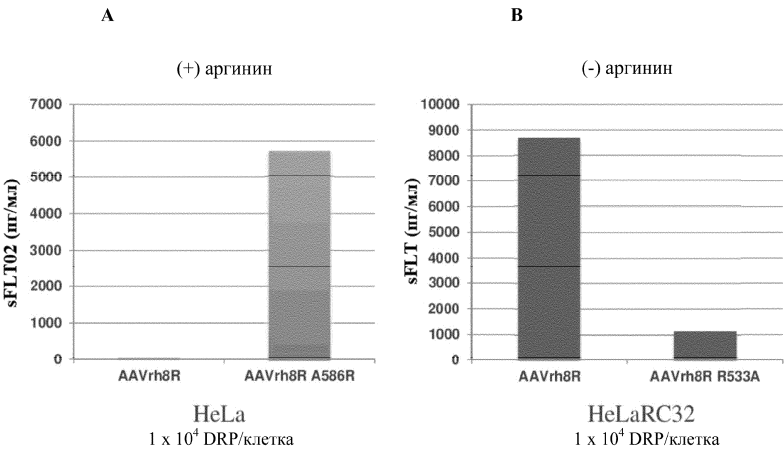
Фиг. 13

№ аминокислоты AAV2	484	487	532	585	588
AAV2	R	R	K	R	R
AAVrh8R	R	R	R	A	T
№ аминокислоты AAVrh8R	485	488	533	586	589

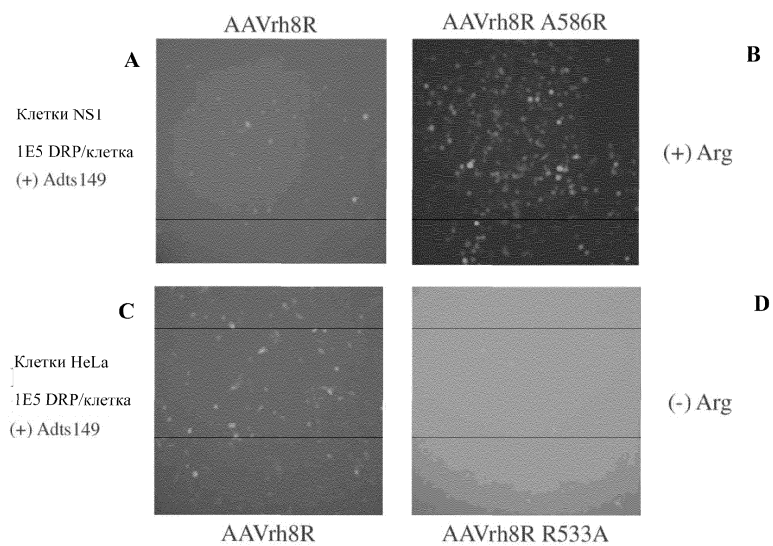
Фиг. 14

№ аминокислоты AAV2	484	487	532	585	588
AAV2	R	R	K	R	R
AAVrh8R	R	R	R	A	T
AAVrh8R A586R	R	R	R	(R)	T
AAVrh8R R533A	R	R	(A)	A	T
№ аминокислоты AAVrh8R	485	488	533	586	589

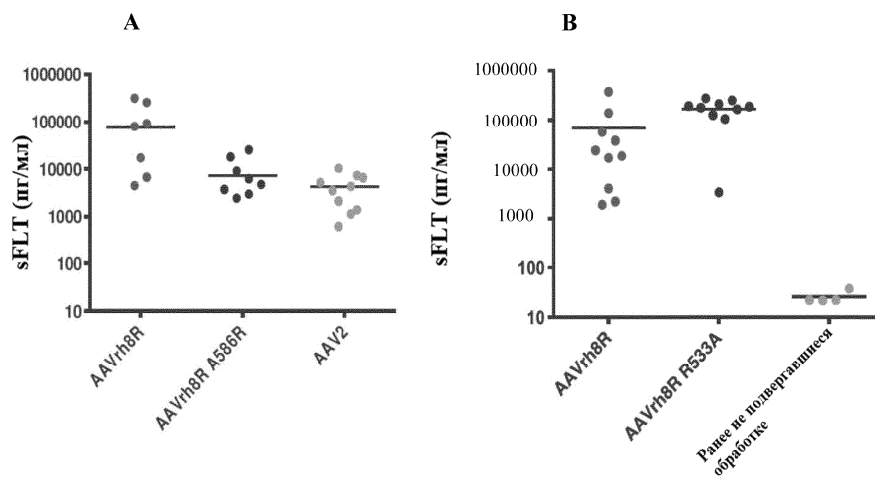
Фиг. 15



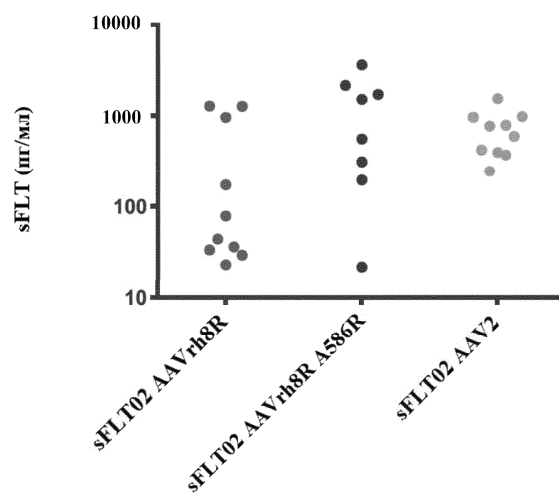
Фиг. 16



Фиг. 17



Фиг. 18



Фиг. 19

№ аминокислоты AAV	484	487	527	532	585	588
AAV2	R	R	K	K	R	R
№ аминокислоты AAV	485	488	528	533	586	589
AAV1	R	R	K	K	S	T
AAV6	R	R	K	K	S	T
AAV9	R	R	K	R	S	A
AAVrh8R	R	R	K	R	A	T
№ аминокислоты AAV	487	490	530	535	588	591
AAV8	R	R	K	R	Q	T
AAVrh10	R	R	K	R	Q	A

Фиг. 20

