

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **201991911** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
**2020.02.20**

(22) Дата подачи заявки  
**2018.02.15**

(51) Int. Cl. **C12N 15/861** (2006.01)  
**C12N 15/34** (2006.01)  
**C12N 7/00** (2006.01)  
**C12N 7/02** (2006.01)  
**C12N 7/04** (2006.01)  
**A61K 48/00** (2006.01)  
**C07K 14/00** (2006.01)

**(54) СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ПЕРЕНОСА ГЕНОВ ПО СОСУДИСТОЙ СЕТИ**

(31) **62/459,286**

(32) **2017.02.15**

(33) **US**

(86) **PCT/US2018/018381**

(87) **WO 2018/152333 2018.08.23**

(71) Заявитель:

**ДЗЕ ЮНИВЕРСИТИ ОФ НОРТ  
КАРОЛИНА ЭТ ЧЕПЕЛ ХИЛЛ (US)**

(72) Изобретатель:

**Асокан Аравинд, Мурлидхаран  
Гиридхар, Олбрайт Блейк (US)**

(74) Представитель:

**Медведев В.Н. (RU)**

(57) Изобретение относится к капсидным белкам AAV, содержащим модификацию в аминокислотной последовательности, и капсидам вирусов и вирусным векторам, содержащим модифицированный капсидный белок AAV. Изобретение также относится к способам введения вирусных векторов и капсидов вирусов согласно раскрытию в клетку или пациенту *in vivo*.



**A1**

**201991911**

**201991911**

**A1**

**СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ПЕРЕНОСА ГЕНОВ ПО СОСУДИСТОЙ СЕТИ****Перекрестная ссылка**

Согласно настоящей заявке по § 119(e) 35 раздела свода законов США испрашивается приоритет в соответствии с временной заявкой на выдачу патента США № 62/459286, поданной 15 февраля 2017 г., которая полностью включена в настоящее описание посредством ссылки для всех целей.

**Заявление о государственной поддержке**

Это изобретение было сделано при государственной поддержке в рамках грантов № R01HL112761 и R01HL089221, присужденных Национальными институтами здравоохранения. Правительство имеет определенные права на изобретение.

**Список последовательностей**

Список последовательностей, связанный с этой заявкой, предоставлен в текстовом формате вместо бумажной копии и тем самым включен в описание посредством ссылки. Название текстового файла, содержащего список последовательностей, – STRD\_004\_01WO\_SeqListSST25.txt. Текстовый файл имеет размер 4 Кб, и был создан 14 февраля 2018 г. И подан в электронном виде через EFS–Web.

**Область техники, к которой относится изобретение**

Настоящее изобретение относится к модифицированным капсидным белкам из аденоассоциированного вируса (AAV) и капсидам вирусов и содержащим их вирусным векторам. В частности, изобретение относится к модифицированным капсидным белкам AAV и содержащим их капсидам, которые можно встраивать в вирусные векторы для придания требуемого профиля трансдукции в отношении интересующей ткани (тканей)–мишеней.

**Уровень техники**

Новые штаммы аденоассоциированного вируса (AAV), выделенные из тканей животных и аденовирусных банков, расширили панель AAV векторов, доступных для терапевтического применения переноса генов. В настоящее время предпринимаются всесторонние усилия для картирования тропизмов к тканям этих изолятов AAV в животных моделях. Способность направлять стремление AAV векторов в выбранные органы может быть использована в генной терапии и другом терапевтическом применении.

Настоящее изобретение направлено на существующую в данной области потребность в векторах доставки нуклеиновых кислот с требуемыми характеристиками нацеливания.

**Сущность изобретения**

Согласно некоторым вариантам осуществления, изобретение относится к

капсидному белку аденоассоциированного вируса (AAV), причем капсидный белок AAV содержит модификацию в аминокислотных остатках S262, A263, S264, T265, A267, S268 и H272 и одну вставку аминокислотного остатка между остатками G266 и A267, (нумерация VP1), причем нумерация каждого остатка основана на аминокислотной последовательности AAV1 (SEQ ID NO:1) или эквивалентном аминокислотном остатке в AAV2 (SEQ ID NO:2), AAV3 (SEQ ID NO:3), AAV6 (SEQ ID NO:4), AAV7 (SEQ ID NO:5), AAV8 (SEQ ID NO:6), AAV9 (SEQ ID NO:7) или AAVrh10 (SEQ ID NO:8). Согласно некоторым вариантам осуществления капсидный белок AAV согласно настоящему изобретению может дополнительно содержать модификацию в аминокислотных остатках Q148, E152, S157, T162, T326, D328, V330, T331, V341 и S345 и одну вставку аминокислотного остатка между остатками E152 и P153 (нумерация VP1), причем нумерация каждого остатка основана на аминокислотной последовательности SEQ ID NO:1 или эквивалентном аминокислотном остатке в SEQ ID NO:2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8. Согласно дополнительным вариантам осуществления капсидный белок AAV согласно настоящему изобретению может дополнительно содержать модификацию аминокислотных остатков L188, S205, N223 и A224 (нумерация VP1), причем нумерация каждого остатка основана на аминокислотной последовательности SEQ ID NO:1 или эквивалентном аминокислотном остатке в SEQ ID NO:2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8.

Согласно некоторым вариантам осуществления, изобретение относится к капсидному белку аденоассоциированного вируса (AAV), причем капсидный белок AAV содержит модификацию в аминокислотных остатках S262, A263, S264, T265 и A267 (нумерация VP1) и одну вставку аминокислотного остатка между остатками S268 и N269, причем аминокислотные остатки основаны на аминокислотной последовательности AAV1 (SEQ ID NO:1) или эквивалентных аминокислотных остатках в AAV2 (SEQ ID NO:2), AAV3 (SEQ ID NO:3), AAV6 (SEQ ID NO:4), AAV7 (SEQ ID NO:5), AAV8 (SEQ ID NO:6), AAV9 (SEQ ID NO:7) или AAVrh10 (SEQ ID NO:8). Согласно некоторым вариантам осуществления капсидный белок дополнительно содержит модификацию в аминокислотном остатке H272. Согласно некоторым вариантам осуществления капсидный белок AAV дополнительно содержит модификацию в аминокислотных остатках Q148, E152, S157, T162, H272, T326, D328, V330, T331, V341 и S345 и одну вставку аминокислотного остатка между остатками E152 и P153. Согласно дополнительным вариантам осуществления капсидный белок AAV дополнительно содержит модификацию в аминокислотных остатках L188, S205, N223, A224, и H272.

Согласно некоторым вариантам осуществления, изобретение относится к капсидному белку аденоассоциированного вируса (AAV), причем капсидный белок AAV содержит модификацию, которая приводит к аминокислотной последовательности:  $X^1-X^2-X^3-X^4$  (SEQ ID NO: 35) в аминокислотах, соответствующей положениям аминокислот 262–265 (нумерация VP1) нативного AAV1 капсидного белка (SEQ ID NO: 1), причем  $X^1$  представляет собой любую аминокислоту, не являющуюся S; причем  $X^2$  представляет собой любую аминокислоту, не являющуюся A; причем  $X^3$  представляет собой любую

аминокислоту, не являющуюся S; и при этом X<sup>4</sup> представляет собой любую аминокислоту, не являющуюся T.

Согласно некоторым вариантам осуществления, изобретение относится к капсидному белку аденоассоциированного вируса (AAV), причем капсидный белок AAV содержит модификацию в аминокислотных остатках S262, A263, S264, T265, A267, и H272 и одну вставку аминокислотного остатка между остатками S268 и N269, (нумерация VP1), причем нумерация каждого остатка основана на аминокислотной последовательности AAV1 (SEQ ID NO:2) или эквивалентном аминокислотном остатке в AAV1 (SEQ ID NO:1), AAV3 (SEQ ID NO:3), AAV6 (SEQ ID NO:4), AAV7 (SEQ ID NO:5), AAV8 (SEQ ID NO:6), AAV9 (SEQ ID NO:7) или AAVrh10 (SEQ ID NO:8).

Согласно некоторым вариантам осуществления, изобретение относится к капсидному белку аденоассоциированного вируса (AAV), причем капсидный белок AAV содержит модификацию в аминокислотных остатках S262, Q263, S264, A266, S267 и H271, и вставку по меньшей мере одного аминокислотного остатка между остатками S261 и S262, (нумерация VP1), причем нумерация каждого остатка основана на аминокислотной последовательности AAV2 (SEQ ID NO:2) или эквивалентном аминокислотном остатке в AAV1 (SEQ ID NO:1), AAV3 (SEQ ID NO:3), AAV6 (SEQ ID NO:4), AAV7 (SEQ ID NO:5), AAV8 (SEQ ID NO:6), AAV9 (SEQ ID NO:7) или AAVrh10 (SEQ ID NO:8).

Согласно некоторым вариантам осуществления, изобретение относится к капсидному белку аденоассоциированного вируса (AAV), причем капсидный белок AAV содержит модификацию в аминокислотных остатках S262, Q263, S264, A266, A267, H271 и одну вставку аминокислотного остатка между остатками S261 и S262, причем нумерация каждого остатка основана на аминокислотной последовательности AAV3 (SEQ ID NO:3) или эквивалентном аминокислотном остатке в AAV1 (SEQ ID NO:1), AAV2 (SEQ ID NO:2), AAV6 (SEQ ID NO:4), AAV7 (SEQ ID NO:5), AAV8 (SEQ ID NO:6), AAV9 (SEQ ID NO:7) или AAVrh10 (SEQ ID NO:8).

Согласно некоторым вариантам осуществления, изобретение относится к капсидному белку аденоассоциированного вируса (AAV), причем капсидный белок AAV содержит модификацию в аминокислотных остатках S263, S269, A237 (нумерация VP1), причем нумерация каждого остатка основана на аминокислотной последовательности AAV9 (SEQ ID NO:9) или эквивалентном аминокислотном остатке в AAV1 (SEQ ID NO:1), AAV2 (SEQ ID NO:2), AAV3 (SEQ ID NO:3), AAV6 (SEQ ID NO:4), AAV7 (SEQ ID NO:5), AAV8 (SEQ ID NO:6) или AAVrh10 (SEQ ID NO:8).

Согласно некоторым вариантам осуществления, изобретение относится к капсидному белку аденоассоциированного вируса (AAV), причем капсидный белок AAV содержит последовательность согласно любой одной из SEQ ID NO: 9–SEQ ID NO: 34.

Настоящее изобретение дополнительно относится к капсиду AAV, содержащему капсидный белок согласно раскрытию, а также вирусному вектору, содержащему капсид AAV согласно раскрытию. Согласно некоторым вариантам осуществления вирусный вектор содержит капсид AAV согласно раскрытию и нуклеиновую кислоту, содержащую



по меньшей мере одну концевую повторяющуюся последовательность, причем нуклеиновая кислота заключена в капсид AAV.

Настоящее изобретение дополнительно относится к фармацевтическим композициям, содержащим капсиды AAV и/или вирусные векторы, раскрытые в настоящем изобретении.

Также настоящее изобретение относится к способу введения в клетку молекулы нуклеиновой кислоты, включающему введение клетки в контакт с вирусным вектором согласно раскрытию, а также к способу доставки пациенту молекулы нуклеиновой кислоты, включающему введение пациенту вирусного вектора согласно раскрытию.

Кроме того, изобретение относится к способу выборочной доставки интересующей молекулы нуклеиновой кислоты в нейронную клетку, включающему введение нейронной клетки в контакт с вирусным вектором согласно настоящему изобретению, причем вирусный вектор содержит интересующую молекулу нуклеиновой кислоты.

Согласно еще одному варианту осуществления изобретение относится к способу лечения неврологического расстройства или нарушения у пациента, включающему введение пациенту вирусного вектора согласно раскрытию, причем вирусный вектор содержит молекулу нуклеиновой кислоты, которая кодирует терапевтический белок или терапевтическую РНК, эффективную при лечении неврологического расстройства или нарушения.

Эти и другие аспекты рассматриваются более подробно в изложенном ниже описании.

### **Краткое описание фигур**

ФИГ. 1. Количественная оценка трансдукции кортикальных нейронов. Самкам мышей BL6 в возрасте 6–8 недель вводили системно путем инъекций в хвостовую вену дозу  $5 \times 10^{11}$  vg (векторные геномы) векторов с упакованным Cbh–scGFP (AAV1, AAV1R6 или AAV1R7) или PBS в виде отрицательного контроля. Мышей умерщвляли через 21 день после инъекции, а ткани собирали, фиксировали и иссекали. Ткани иммуноокрашивали на GFP с использованием субстрата DAB, экспрессию GFP визуализировали посредством сканирования слайдов и программного обеспечения ImageScope. GFP–положительные нейроны в коре головного мозга подсчитывали вручную, определяли количество и усредняли по множеству коронарных срезов головного мозга на мышшь. N=2 для AAV1; n=3 для AAV1R6 и AAV1R7.

ФИГ. 2. Преодоление сосудистой сети головного мозга и нейронная экспрессия. Векторы AAV с упакованным трансгеном Cbh–scGFP вводили мышам C57/Bl6 путем инъекции в хвостовую вену в дозе  $5 \times 10^{11}$  vg. Мышей умерщвляли через 21 день после инъекции, ткани собирали, фиксировали, иссекали, окрашивали DAB для обнаружения GFP, визуализировали с помощью сканера Aperio, а обработку изображений проводили с помощью программного обеспечения ImageScope. Сокращения: Кора (CTX), моторная кора (MCT), стриатум (STR), гиппокамп (HC), зубчатая извилина (DG). N=3.

ФИГ. 3. Ненацеливание на печень. Векторы AAV с упакованным трансгеном CBA–

люциферазы вводили мышам C57/Bl6 путем инъекции в хвостовую вену в дозе  $1 \times 10^{11}$  vg. Мышей умерщвляли через 14 дней после инъекции, ткани собирали, измельчали, лизировали, и проводили анализы люциферазы для обнаружения относительных уровней трансдукции для тканей головного мозга, сердца, печени и спинного мозга. Данные нормировали в виде относительных световых единиц на грамм ткани.  $N=3$ .

**ФИГ. 4А–С.** Филогенетические и структурные анализы библиотеки капсидов AAV1/rh.10 с заменой домена. **ФИГ. 4А.** Схема панели типичных химерных капсидов AAV1/rh.10, выделенных из библиотеки, демонстрирующая на аминокислотном уровне разнообразие последовательностей замен доменов, полученных путем перестановки. Отдельные родительские или химерные капсиды перечислены вертикально, тогда как горизонтально отображена последовательность капсидов VP1 с разными заменами доменов от N-конца слева до C-конца справа. Полученные из AAV1 остатки показаны серым, AAVrh.10 остатки – зелено-голубым, а консенсусные остатки между ними – черным. **ФИГ. 4В.** Филогенез методом ближайших соседей последовательностей капсидов VP1 химерных капсидов AAV1/rh.10. Аминокислотные последовательности капсидов выравнивали с помощью ClustalW, а филогенез генерировали с использованием алгоритма метода ближайших соседей. Поправку Пуассона использовали для расчета расстояний между аминокислотами, представленных в единицах количества аминокислотных замен на сайт. Дерево нарисовано в масштабе, с длиной ветвей в тех же единицах, что у эволюционных расстояний, используемых для построения дерева. Бутстреп-значения рассчитывали с 1000 повторов, а после ветвей показано процентное значение деревьев повторов, в которых связанные таксоны, сгруппированные вместе. **ФИГ. 4С.** Трехмерные поверхностные модели тримера субъединицы капсида/области оси симметрии 3 порядка мутантов родительских и типичных химерных капсидов AAV, выбранных для скрининга *in vivo*. Аминокислотные остатки, полученные из AAV1, показаны серым, тогда как остатки, полученные из AAVrh.10, показаны зелено-голубым. Структурные модели визуализировали и генерировали с использованием PyMol.

**ФИГ. 5.** При скрининге *In vivo* получают химеры AAV1/rh.10, способные преодолевать гематоэнцефалический барьер после внутривенного введения. Изображения иммуноокрашенных срезов головного мозга, показывающие экспрессию GFP в коре головного мозга, опосредованную родительскими или химерными векторами с упакованным трансгеном Cbh-scGFP, через три недели после введения путем инъекции в хвостовую вену в дозе  $5 \times 10^{11}$  vg (или PBS в случае имитационного лечения). Глобальный коронарный срез головного мозга (вверху) указывает выделенную квадратом область коры, видную на вставках, показанных для каждого родительского или химерного вектора, отображающих их индивидуальные профили трансдукции. Масштабная линейка=100 мкм.

**ФИГ. 6А–Г.** Скрининг *In vivo* химер AAV1/rh.10 по их способности преодолевать гематоэнцефалический барьер и трансдуцировать различные области головного мозга после внутрисосудистого введения. Мыши получали дозу  $5 \times 10^{11}$  vg либо родительского

(AAV1 или AAVrh.10), либо химерного вектора с упакованным трансгеном Cbh-scGFP путем инъекции в хвостовую вену. Иммуноокрашенные и визуализированные срезы головного мозга мыши показывают экспрессию GFP в виде черного/темно коричневого окрашивания через 21 день после инъекции. Масштабная линейка=100 мкм. Глобальный коронарный срез головного мозга сверху фигуры указывает различные области головного мозга, показанные на вставках: МСТ, моторная кора (ФИГ. 6А); НС, гиппокамп (ФИГ. 6В); DG, зубчатая извилина (ФИГ. 6С); ТН, таламус (фиг. 6D); НУ, гипоталамус (ФИГ. 6Е); STR, стриатум (ФИГ. 6F); Amg, миндалина (ФИГ. 6G). n=3 для каждого.

ФИГ. 7А–Н. Профиль трансдукции ЦНС AAV1R6 и AAV1R7 сравнивали с родительским AAV1 и AAVrh.10 в головном мозге. Показаны профили трансдукции через три недели после инъекции в хвостовую вену AAV векторов с упакованным трансгеном Cbh-scGFP в дозе  $5 \times 10^{11}$  vg для родительские серотипов, AAV1 и AAVrh.10 (левые колонки), и для AAV1R6 и AAV1R7 (правые колонки), в разных областях головного мозга, включая моторную кору (ФИГ. 7А), (соматосенсорную) кору головного мозга (ФИГ. 7В), гиппокамп (ФИГ. 7С), зубчатую извилину (ФИГ. 7D), таламус (ФИГ. 7Е), гипоталамус (ФИГ. 7F), стриатум (ФИГ. 7G) и миндалину (ФИГ. 7Н). Масштабная линейка=100 мкм.

ФИГ. 8А–Н. Количественное сравнение уровней нейрональной и глиальной трансдукции для родительских и химерных вариантов капсидов. Относительные уровни нейрональной трансдукции через 3 недели после введения векторов с упакованным трансгеном Cbh-scGFP путем инъекции в хвостовую вену в дозе  $5 \times 10^{11}$  vg количественно определяли путем подсчета количества трансдуцированных нейронов и глии, идентифицированных на основе морфологии для каждой области головного мозга, на коронарный срез 50 мкм. Трансдукция родительских серотипов, AAV1 и AAVrh.10, показана вместе с химерными вариантами, AAV1R6 и AAV1R7, в разных областях головного мозга, включая моторную кору (ФИГ. 8А), (соматосенсорную) кору головного мозга (ФИГ. 8В), гиппокамп (ФИГ. 8С), зубчатую извилину (ФИГ. 8D), таламус (ФИГ. 8Е), гипоталамус (ФИГ. 8F), стриатум (ФИГ. 8G) и миндалину (ФИГ. 8Н). Столбики погрешностей отображают стандартное отклонение ( $n > 3$  или=3). Чтобы продемонстрировать статистическую значимость для нейрональной и глиальной трансдукции в каждой общей группе относительно AAV1, и что различия между средними были статистически значимыми, соответственно, использовали непарный двусторонний Т-критерий с поправкой Уэлча и односторонний ANOVA. ns, незначимый; \*,  $P < 0,05$ .

ФИГ. 9А–F. Структурный анализ химерного варианта капсида AAV1R6. (ФИГ. 9А) выравнивание последовательностей AAV1R6 с AAV1 & AAVrh.10 выделяет аминокислотные остатки (нумерация AAV1R6), которые уникальным образом получают из AAVrh.10 (показано черным шрифтом и выделено синим). Консервативные остатки отмечены красным и выделены желтым, тогда как неконсервативные эквивалентные остатки на AAV1 показаны черным или зеленым текстом и выделены либо зеленым, либо

белым. Трехмерную структурную модель мономера химерной субъединицы AAV1R6 VP3 (ФИГ. 9B) генерировали с использованием SWISS-MODEL, причем кристаллическая структура AAV8 служит в качестве матрицы для гомологичного моделирования (PDB ID: 2QAO). Поверхностные модели тример димер/ось симметрии 2 порядка (ФИГ. 9C), тример/ось симметрии 3 порядка (ФИГ. 9D), пентамер/ось симметрии 5 порядка (ФИГ. 9E) субъединицы AAV1R6 VP3 и поверхностный рендеринг интактного капсида AAV1R6 (60мер) (ФИГ. 9F) генерировали с помощью генератора олигомеров VIPERdb и визуализировали с использованием PyMol. Остатки, полученные из AAV1, окрашены серым, тогда как остатки, полученные из AAVrh.10, сгруппированные по основанию выступов по оси симметрии 3 порядка, по углублению по оси симметрии 2 порядка и по порам 5 порядка, окрашены зеленовато-голубым.

ФИГ. 10A–B. Относительную трансдукцию клеток сердца и печени посредством AAV1R6 и AAV1R7 сравнивали с родительскими капсидами. Либо родительские (AAV1 или AAVrh.10), либо химерные (AAV1R6 или AAV1R7) векторы с упакованным трансгеном Cbh-scGFP вводили в дозе  $5 \times 10^{11}$  vg путем инъекции в хвостовую вену. Через 21 день после инъекции срезы сердца и печени иммуноокрашивали на GFP и визуализировали. ФИГ. 10A. Флюоресценция GFP для тканей сердца (верхняя панель) и печени (нижняя панель) у мышей, обработанных либо PBS (Имитация), AAV1, AAVrh.10, AAV1R6, либо AAV1R7. ФИГ. 10B. Уровни трансдукции для сердца (вверху) и печени (внизу) при измерении посредством количественной оценки относительной флюоресценции на нескольких изображениях, сделанных для каждой обработки. Столбики отображают диапазон от самых низких до самых высоких значений, причем центральная линия отображает среднее значение по выборкам. Относительную флюоресценцию нормировали по тканям с имитационной обработкой. Столбики погрешностей отображают стандартное отклонение ( $n=3$ ). Для каждой группы выполняли односторонний ANOVA и непарный двусторонний Т-критерий с поправкой Уэлча, и показана значимость относительно AAVrh.10. ns, незначимый. \*,  $P < 0,05$ .

ФИГ. 11A–H. Рациональная структура и функциональное картирование минимальной области узнавания AAVrh.10 для преодоления BBB. ФИГ. 11A выравнивание последовательностей AAV1RX с AAV1 и AAVrh.10 показывает пронумерованные аминокислотные остатки внутри и рядом с нейротропной областью узнавания. Консервативные остатки выделены желтым, остатки, составляющие область узнавания, выделены голубым, а неконсервативные остатки выделены либо зеленым, либо белым. Структурные модели сконструированного химерного капсида AAV1RX создавали с использованием программного обеспечения SWISS-MODEL для моделирования на основе гомологии, а VIPERdb использовали для генерирования олигомеров. PyMol использовали для генерирования представляющей поверхность модели мономера субъединицы AAV1RX VP3 (ФИГ. 11B), тример димер/ось симметрии 2 порядка (ФИГ. 11C), тример/ось симметрии 3 порядка (ФИГ. 11D), пентамер/ось симметрии 5 порядка (ФИГ. 11E) и полный капсид (60-мер) (ФИГ. 11F). Полученные из AAV1 аминокислоты и аминокислоты,

гомологичные между AAV1 и AAVrh.10, отображают серым, тогда как остатки, содержащие нейротропную область узнавания из AAVrh.10 для преодоления BBB, изображены зеленовато-голубым. ФИГ. 11G. Стереографическая перспективная проекция показывает нейротропную область узнавания, если смотреть вниз по оси симметрии 3 порядка на капсиде AAV1RX, и ее создавали с использованием RIVEM. Показаны только открытые на поверхности аминокислотные остатки, причем границы между ними обозначены черными линиями. Зеленые области изображают топологические выступы по оси симметрии 3 порядка, тогда как синие области изображают топологические углубления. Ключевые аминокислотные остатки этой области узнавания окрашены пурпурным (нумерация AAVrh.10 VP1). ФИГ. 11H. Профиль трансдукции ЦНС AAV1RX с упакованным трансгеном Cbh-scGFP, введенным путем инъекции в хвостовую вену в дозе  $5 \times 10^{11}$  vg. Иммуноокрашивали и визуализировали срезы, сделанные через 21 день после инъекции. Масштабная линейка=100 мкм.

ФИГ. 12A–H. Трансдукция периферических тканей и биораспределения AAV1R6, AAV1R7 и AAV1RX после внутривенного введения. Мышам инъектировали через хвостовую вену PBS или векторы либо AAV1, AAVrh.10, AAV1R6, AAV1R7, либо AAV1RX с упакованным репортерным трансгеном CBA-Luc в дозе  $1 \times 10^{11}$  vg. Через 2 недели после инъекции количественно определяли уровни экспрессии репортерного трансгена люциферазы (ФИГ. 12A, 12C, 12E, 12G) и биораспределение копий вирусного генома в разных тканях (ФИГ. 12B, 12D, 12F, 12H). Уровни экспрессии люциферазы нормировали к граммам лизата ткани и отображали в виде относительных световых единиц. Копии генома вектора (vg) нормировали к ламину В мыши (mLamB) в качестве эндогенного гена домашнего хозяйства и отображали в виде копий vg на клетку. Столбики погрешностей отображают стандартное отклонение ( $n=3$  для анализов люциферазы;  $n=4$  для биораспределения). Для каждой группы выполняли односторонний ANOVA и непарный двусторонний Т-критерий с поправкой Уэлча, и показана значимость относительно AAVrh.10. ns, незначимый. \*,  $P < 0,05$ .

ФИГ. 13A–H. Количественная оценка уровней нейрональной и глиальной трансдукции, опосредованной AAV1RX, сравнивали с родительскими и другими химерными вариантами капсидов. Мыши получали дозу  $5 \times 10^{11}$  vg либо родительского (AAV1 или AAVrh.10), либо химерного вектора с упакованным трансгеном Cbh-scGFP путем инъекции в хвостовую вену. Через 3 недели после инъекции брали головной мозг, иссекали, иммуноокрашивали на GFP и визуализировали. Иммуноокрашивали на GFP и визуализировали относительные уровни нейрональной и глиальной трансдукции. Относительные уровни нейрональной и глиальной трансдукции количественно определяли путем подсчета количества трансдуцированных нейронов и глии, идентифицированных на основе морфологии для каждой области на коронарный срез 50 мкм. Показаны уровни трансдукции AAV1RX вместе с уровнями трансдукции для родительских серотипов, AAV1 & AAVrh.10, а также химерных вариантов, AAV1R6 и AAV1R7, в разных областях, включая моторную кору (ФИГ. 13A), кору головного мозга

(ФИГ. 13В), гиппокамп (ФИГ. 13С), зубчатую извилину (ФИГ. 13D), таламус (ФИГ. 13Е), гипоталамус (ФИГ. 13F), стриатум (ФИГ. 13G) и миндалину (ФИГ. 13H). Столбики погрешностей отображают стандартное отклонение ( $n=3$ ). Чтобы продемонстрировать статистическую значимость каждой группы относительно AAV1, использовали непарный двусторонний Т-критерий с поправкой Уэлча. ns: не статистически значимыми; \*,  $P < 0,05$ . Для демонстрации, что различия между средними также являются статистически значимыми, использовали односторонний ANOVA. \*,  $P < 0,05$  для нейрональной и глиальной трансдукции для всех показанных в настоящем изобретении областей головного мозга.

ФИГ. 14. Выравнивание последовательностей 1RX области узнавания и варибельной области I (VR-I) для обычных серотипов AAV. Выравнивание последовательностей AAV1RX с обычными AAV серотипами выделяет аминокислотные остатки (нумерация VP1) области узнавания 1RX, в более широкого контекста варибельной области I (VR-I), по сравнению с обычными естественными серотипами AAV. Черные линии выше и ниже обозначают конкретные остатки внутри области узнавания 1RX. Пояснение: Остатки, которые являются идентичными для всех серотипов, отображают красными буквами на желтом фоне; консервативные остатки, синие буквы на голубом фоне; похожие остатки, черные буквы на зеленом фоне; слабо похожие остатки, зеленые буквы на белом фоне; непохожие остатки, черные буквы на белом фоне. Это выравнивание последовательностей создавали с использованием программного обеспечения Vector NTI Advance 11,5,2.

ФИГ. 15. Выравнивание последовательностей капсидного белка AAV1, AAV1R7 и AAVrh.10 VP1.

### **Подробное описание**

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем изобретении, имеют то же значение, которое обычно понимают специалисты в области техники, к которой относится это раскрытие. Используемая здесь терминология предназначена только для описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения. Все публикации, заявки на патенты, патенты и другие упомянутые в настоящем изобретении ссылки полностью включены в настоящее описание посредством ссылки.

### **Определение**

Следующие термины используют в описании в настоящем изобретении и прилагаемой формуле изобретения:

если в контексте четко не указано иное, формы единственного числа также включают формы множественного числа.

Кроме того, подразумевается, что термин «приблизительно» в рамках настоящего изобретения при ссылке на измеримое значение, такое как величина длины полинуклеотидной или полипептидной последовательности, дозы, времени, температуры и тому подобное, охватывает отклонения  $\pm 20\%$ ,  $\pm 10\%$ ,  $\pm 5\%$ ,  $\pm 1\%$ ,  $\pm 0,5\%$  или даже  $\pm 0,1\%$

указанной величины.

Также в рамках настоящего изобретения «и/или» относится и охватывает любую и все возможные комбинации одного или более связанных перечисленных элементов, а также отсутствие комбинаций при интерпретации в альтернативе («или»).

В рамках настоящего изобретения переходное словосочетание «состоящий по существу из» означает, что объем пункта формулы изобретения следует интерпретировать, как охватывающий указанные материалы или стадии, перечисленные в пункте формулы изобретения, «и те, которые не существенно не влияют на основную и новую характеристику (характеристики)» заявленного изобретения. См. In re Herz, 537 F.2d 549, 551–52, 190 USPQ 461, 463 (CCPA 1976) (подчеркнуто в оригинале); см. Также МРЕР § 2111.03. Таким образом, термин «состоящий по существу из» при использовании в пункте формулы изобретения не предназначен для интерпретации в качестве эквивалента «содержащий».

Если в контексте не указано иное, конкретно подразумевается, что различные признаки капсидных белков, векторов, композиций и способов, описанные в настоящем изобретении, можно использовать в любой комбинации.

Кроме того, в настоящем раскрытии также предусмотрено, что согласно некоторым вариантам осуществления любой признак или комбинацию признаков, изложенных в настоящем изобретении, можно исключить или пропустить.

Кроме того, для иллюстрации, если, например, в описании указано, что конкретную аминокислоту можно выбрать из A, G, I, L и/или V, это выражение также указывает, что аминокислоту можно выбрать из любого подмножества этой аминокислоты (аминокислот), например, A, G, I или L; A, G, I или V; или G; только L; и т.д. Как если бы каждая такая подкомбинация была явно изложена в настоящем изобретении. Кроме того, такое выражение также указывает, что одну или более указанных аминокислот можно отклонить. Например, в отдельных вариантах осуществления аминокислота не является A, G или I; не A; не G или V; и т.д., как если бы каждый такой возможный отказ был явно изложен в настоящем изобретении.

В рамках настоящего изобретения термины «уменьшить», «уменьшает», «уменьшение» и аналогичные термины означают уменьшение по меньшей мере приблизительно на 25%, 35%, 50%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97% или более относительно контроля или ссылки.

В рамках настоящего изобретения термины «увеличивать», «увеличивает» «увеличение», «улучшить», «улучшает», «улучшение» и аналогичные термины обозначают увеличение или улучшение по меньшей мере приблизительно на 5%, 10%, 20%, 25%, 50%, 75%, 100%, 150%, 200%, 300%, 400%, 500% или более относительно контроля или ссылки.

Термин «парвовирус» в рамках настоящего изобретения охватывает семейство Parvoviridae, включая автономно реплицирующиеся парвовирусы и депендовирусы. Автономные парвовирусы содержат члены родов Parvovirus, Erythrovirus, Densovirus,

Iteravirus и Contravirus. Иллюстративные автономные парвовирусы включают, но без ограничения, минут-вирус мыши, бычий парвовирус, собачий парвовирус, куриный парвовирус, вирус панлейкопении у кошек, кошачий парвовирус, гусиный парвовирус, парвовирус H1, парвовирус мускусной утки, вирус B19 и любой другой самостоятельный парвовирус, известный теперь или открытый позже. Специалистам в данной области известны другие самостоятельные парвовирусы. См. Например, BERNARD N. FIELDS с соавт. VIROLOGY, volume 2, chapter 69 (4th ed. Lippincott–Raven Publishers).

В рамках настоящего изобретения термин «аденоассоциированный вирус» (AAV) включает, но без ограничения, AAV 1 типа, AAV 2 типа, AAV 3 типа (в том числе типы 3A и 3B), AAV 4 типа, AAV 5 типа, AAV 6 типа, AAV 7 типа, AAV 8 типа, AAV 9 типа, AAV 10 типа, AAV типа rh10, AAV 11 типа, AAV 12 типа, птичий AAV, бычий AAV, собачий AAV, конский AAV, овечий AAV и любой другой AAV, известный теперь или открытый позже. См. Например, BERNARD N. FIELDS с соавт. VIROLOGY, volume 2, chapter 69 (4th ed. Lippincott–Raven Publishers). Идентифицировано множество AAV серотипов и клад (см. Например, Gao с соавт. (2004) J. Virology 78:6381–6388; Moris с соавт. (2004) Virology 33–:375–383; и Таблицу 1).

В данной области известны геномные последовательности различных серотипов AAV и автономных парвовирусов, а также последовательности нативных концевых повторов (TR), белков Rep и субъединиц капсидов. Такие последовательности можно найти в литературе или в открытых базах данных, таких как база данных GenBank®. См. Например, GenBank Номера Доступа NC\_044927, NC\_002077, NC\_001401, NC\_001729, NC\_001863, NC\_001829, NC\_001862, NC\_000883, NC\_001701, NC\_001510, NC\_006152, NC\_006261, AF063497, U89790, AF043303, AF028705, AF028704, J02275, J01901, J02275, X01457, AF288061, AH009962, AY028226, AY028223, NC\_001358, NC\_001540, AF513851, AF513852, AY530579; раскрытия которых включены в настоящее описание посредством ссылки для описания парвовируса и AAV нуклеиновой кислоты и аминокислотных последовательностей. См. Также, например, Srivistava с соавт. (1983) J. Virology 45:555; Chiorini с соавт. (1998) J. Virology 71:6823; Chiorini с соавт. (1999) J. Virology 73:1309; Bantel–Schaal с соавт. (1999) J. Virology 73:939; Xiao с соавт. (1999) J. Virology 73:3994; Muramatsu с соавт. (1996) Virology 221:208; Shade с соавт. (1986) J. Virol. 58:921; Gao с соавт. (2002) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 99:11854; Moris с соавт. (2004) Virology 33–:375–383; международные патентные публикации WO 00/28061, WO 99/61601, WO 98/11244; и патент США № 6156303; раскрытия которых включены в настоящее описание посредством ссылки для описания парвовируса и AAV нуклеиновой кислоты и аминокислотных последовательностей. См. Также Таблицу 1.

Капсидные структуры автономных парвовирусов и AAV описаны более подробно у BERNARD N. FIELDS с соавт. VIROLOGY, volume 2, chapters 69 и 70 (4th ed. Lippincott–Raven Publishers). См. Также описание кристаллической структуры AAV2 (Xie с соавт. (2002) Proc. Nat. Acad. Sci. 99:10405–10), AAV4 (Padron с соавт. (2005) J. Virol. 79: 5047–58), AAV5 (Walters с соавт. (2004) J. Virol. 78: 3361–71) и CPV (Xie с соавт. (1996) J. Mol.



Biol. 6:497–520; Tsao с соавт. (1991) Science 251:1456–64; Drouin с соавт. (2013) Future Virol. 8(12):1183–1199).

Термин «тропизм» в рамках настоящего изобретения относится к преимущественному проникновению вируса в некоторые клетки или ткани, необязательно с последующей экспрессией (например, транскрипцией и, необязательно, трансляцией) последовательности (последовательностей), переносимых вирусным геномом в клетку, например, для рекомбинантного вируса, экспрессии интересующей гетерологичной нуклеиновой кислоты (кислот). Специалистам в данной области будет понятно, что согласно некоторым вариантам осуществления транскрипцию гетерологичной последовательности нуклеиновой кислоты из вирусного генома нельзя инициировать в отсутствие транс-действующих факторов, например, для индуцируемого промотора или иной регулируемой нуклеотидной последовательности. В случае рекомбинантного AAV (гAAV) генома, экспрессия генов из вирусного генома может происходить из стабильно интегрированного провируса и/или из неинтегрированного эписома, а также из любой другой формы, которую вирус может принимать внутри клетки.

В рамках настоящего изобретения «системный тропизм» и «системная трансдукция» (и эквивалентные термины) указывают, что капсид вируса или вирусный вектор согласно раскрытию проявляет тропизм для тканей по всему организму и/или трансдуцирует, соответственно, (например, головной мозг, легкое, скелетные мышцы, сердце, печень, почки и/или поджелудочную железу). Согласно вариантам осуществления наблюдается системная трансдукция центральной нервной системы (например, головного мозга, нейронных клеток и т.д.). Согласно другим вариантам осуществления достигается системная трансдукция сердечных мышечных тканей.

Если не указано иное, «эффективную трансдукцию» или «эффективный тропизм», или аналогичные термины, можно определить посредством ссылки на подходящий контроль (например, по меньшей мере около 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 125%, 150%, 175%, 200%, 250%, 300%, 350%, 400%, 500% или более трансдукции или тропизма, соответственно, контроля). Согласно отдельным вариантам осуществления вирусный вектор эффективно трансдуцирует или имеет эффективный тропизм для нейронных клеток и кардиомиоцитов. Подходящие контроли будут зависеть от множества факторов, включая требуемый профиль тропизма.

Точно также можно определить, является ли вирус «не эффективно трансдуцирующим» или «не имеет эффективного тропизма» для ткани–мишени, или аналогичные термины, посредством ссылки на подходящий контроль. Согласно отдельным вариантам осуществления вирусный вектор не эффективно трансдуцирует (т.е. не имеет эффективного тропизма) для печени, почек, половых желез и/или половых клеток. Согласно отдельным вариантам осуществления нежелательная трансдукция ткани (тканей) (например, печени) составляет 20% или меньше, 10% или меньше, 5% или меньше, 1% или меньше, 0,1% или меньше по сравнению с уровнем трансдукции требуемой ткани (тканей)–мишеней (например, клеток центральной нервной системы;

кардиомиоцитов).

В рамках настоящего изобретения, если не указано иное термин «полипептид» охватывает как пептиды, так и белки.

«Полинуклеотид» представляет собой последовательность нуклеотидных оснований, и может представлять собой последовательности РНК, ДНК или гибрида ДНК–РНК (в том числе как существующие в природе, так и не существующие в природе нуклеотиды), но согласно типовым вариантам осуществления представляют собой последовательности либо одно, либо двухспиральной ДНК.

В рамках настоящего изобретения «выделенный» полинуклеотид (например, «выделенная ДНК» или «выделенная РНК») означает полинуклеотид, который по меньшей мере частично выделен из по меньшей мере некоторых из других компонентов существующего в природе организма или вируса, например, клеточных или вирусных структурных компонентов или других полипептидов или нуклеиновых кислот, обычно находящихся связанными с полинуклеотидом. Согласно типовым вариантам осуществления «выделенная» молекула нуклеиновой кислоты обогащена по меньшей мере приблизительно в 10 раз, в 100 раз, в 1000 раз, в 10000 раз или более по сравнению с исходным материалом.

Также «выделенный» полипептид означает полипептид, который по меньшей мере частично выделен из по меньшей мере некоторых из других компонентов существующего в природе организма или вируса, например, клеточных или вирусных структурных компонентов или других полипептидов или нуклеиновых кислот, обычно находящихся связанными с полипептидом. Согласно типовым вариантам осуществления «выделенный» полипептид обогащен по меньшей мере приблизительно в 10 раз, в 100 раз, в 1000 раз, в 10000 раз или более по сравнению с исходным материалом.

В рамках настоящего изобретения под «выделить» или «очистить» вирусный вектор (или грамматическими эквивалентными), подразумевают, что вирусный вектор по меньшей мере частично выделен из по меньшей мере некоторых из других компонентов исходного материала. Согласно типовым вариантам осуществления «выделенный» или «очищенный» вирусный вектор обогащен по меньшей мере приблизительно в 10 раз, в 100 раз, в 1000 раз, в 10000 раз или более по сравнению с исходным материалом.

В рамках настоящего изобретения «нейронная клетка» включает в себя сенсорные нейроны, псевдо униполярные нейроны, мотонейроны, мультиполярные нейроны, интернейроны и/или биполярные нейроны, расположенные в головном мозге субструктуры, такие как кора, моторная кора, гиппокамп, гипоталамус, стриатум, базальные ганглии, миндалина, мозжечок, дорсальные корешковые ганглии и/или спинной мозг.

«Терапевтический белок» представляет собой белок, который может ослаблять, уменьшать, предотвращать, задерживать и/или стабилизировать симптомы, которые обусловлены отсутствием или нарушением белка в клетке или у пациента и/или представляет собой белок, который иным образом приносит пациенту пользу.

«Терапевтическая молекула РНК» или «функциональная молекула РНК» в рамках настоящего изобретения может представлять собой антисмысловую нуклеиновую кислоту, рибозим (например, как описано в патенте США № 5877022), РНК, которая воздействует на опосредуемый сплайсосомой транс-сплайсинг (см. Puttaraju с соавт. (1999) *Nature Biotech.* 17:246; патент США № 6013487; патент США № 6083702), интерферирующую РНК (RNAi) в том числе siRNA, shRNA или miRNA, которые опосредуют сайленсинг генов (см. Sharp с соавт. (2000) *Science* 287:2431), и любую другую нетранслированную РНК, такую как «направляющая» РНК (Gorman с соавт. (1998) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 95:4929; патент США № 5869248 Yuan et al.) и тому подобное, которые известны в данной области.

Под терминами «лечить», «лечащий» или «лечение» (и их грамматическими вариантами) подразумевают, что тяжесть состояния пациента уменьшается, по меньшей мере частично улучшается или стабилизируется и/или что достигается некоторое облегчение, смягчение, уменьшение или стабилизация по меньшей мере одного клинического симптома, и/или существует задержка прогрессирования болезни или расстройства.

Термины «предотвратить», «предотвращая» и «предотвращение» (и их грамматические варианты) относятся к предотвращению и/или задержке наступления у пациента болезни, расстройства и/или клинического симптома (симптомов) и/или уменьшению тяжести наступления болезни, расстройства и/или клинического симптома (симптомов) относительно того, что произошло бы в отсутствие способов согласно раскрытию. Предотвращение может быть полным, например, общее отсутствие болезни, расстройства и/или клинического симптома (симптомов). Предотвращение также может быть частичным, так что возникновение болезни, расстройства и/или клинического симптома (симптомов) у пациента и/или тяжесть наступления меньше чем то, что произошло бы при отсутствии настоящего раскрытия.

«Эффективным для лечения» количеством в рамках настоящего изобретения является количество, которое является достаточным для обеспечения пациенту некоторого улучшения или пользы. Иначе говоря, «эффективным для лечения» количеством, является количество, которое обеспечит некоторое облегчение, смягчение, уменьшение и/или стабилизацию у пациента по меньшей мере одного клинического симптома. Специалистам в данной области будет понятно, что терапевтическое действие не обязательно должно быть полным или излечивающим, при условии, что пациенту обеспечивают некоторую пользу.

«Эффективным для предотвращения» количеством в рамках настоящего изобретения является количество, которое является достаточным для предотвращения и/или задержки наступления у пациента болезни, расстройства и/или клинических симптомов и/или для уменьшения и/или задержки тяжести наступления у пациента болезни, расстройства и/или клинических симптомов относительно того, что произошло бы в отсутствие способов согласно раскрытию. Специалистам в данной области будет

понятно, что нет необходимости, чтобы уровень предотвращения был полным, при условии, что пациенту обеспечивают некоторую пользу.

Термины «гетерологичная нуклеотидная последовательность» и «гетерологичная молекула нуклеиновой кислоты» в настоящем изобретении используются взаимозаменяемо и относятся к молекуле нуклеиновой кислоты и/или нуклеотидной последовательности, которые не существуют в природе в вирусе. Обычно, гетерологичная молекула нуклеиновой кислоты или нуклеотидная последовательность содержит открытую рамку считывания, которая кодирует интересующий белок или нетранслированную РНК (например, для доставки в клетку или пациенту).

В рамках настоящего изобретения термины «вирусный вектор», «вектор» или «вектор доставки генов» относится к вирусной (например, AAV) частице, которая действует в качестве средства доставки нуклеиновой кислоты и которая содержит геном вектора (например, вирусную ДНК [vDNA]), упакованный внутри вириона. Альтернативно, в некоторых контекстах термин «вектор» можно использовать только для ссылки на геном вектора/vDNA.

«Геном вектора rAAV» или «геном rAAV» представляет собой геном рекомбинантного AAV (т.е. vDNA), который содержит одну или более гетерологичных нуклеотидных последовательностей. Обычно для создания вируса rAAV векторам требуется концевой повтор (повторы) (TR) только в цис. Все другие вирусные последовательности являются необязательными и могут подаваться в транс (Muzyczka (1992) Curr. Topics Microbiol. Immunol. 158:97). Обычно, геном вектора rAAV будет сохранять только одну или более TR последовательность так, чтобы сделать максимальным размер трансгена, который можно эффективно упаковать с помощью вектора. Последовательности, кодирующие структурные и неструктурные белки, можно предоставить в транс (например, из такого вектора, как плаزمид, и/или посредством стабильного встраивания последовательностей в пакующую клетку). Согласно вариантам осуществления геном вектора rAAV содержит последовательность по меньшей мере с одним концевым повтором (TR) (например, AAV TR последовательность), необязательно с двумя TR (например, двумя AAV TR), которые обычно будут на 5' и 3' концах генома вектора и фланкируют последовательность гетерологичной нуклеиновой кислоты, но не обязательно должны прилегать к ней. TR могут быть одинаковыми или отличаться друг от друга.

Термин «концевой повтор» или «TR» включает в себя любой концевой повтор или синтетическую последовательность вируса, которая образует шпилечную структуру и действует в качестве перевернутого концевого повтора (т.е. опосредует требуемые функции, такие как репликация, упаковывание вируса, встраивание и/или спасение провируса и тому подобное). TR может быть AAV TR или не AAV TR. Например, последовательность не AAV TR, например, последовательности других парвовирусов (например, собачий парвовирус (CPV), мышинный парвовирус (MVM), человеческий парвовирус В-19) или последовательность любого другого подходящего вируса

(например, шпилька SV40, которая служит в качестве начала репликации SV40) можно использовать в качестве TR, который можно дополнительно модифицировать путем усечения, замены, делеции, вставки и/или добавления. Кроме того, TR может быть частично или полностью синтетическим, например, «двойной-D последовательностью», как описано в патенте США № 5478745 Samulski с соавт.

«Концевой повтор AAV» или «AAV TR» может быть из любого AAV, включая, но без ограничения серотипы 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или любой другой AAV, известный теперь или открытый позже (см. Например, Таблицу 1). Нет необходимости, чтобы концевой повтор AAV имел нативную концевую повторяющуюся последовательность (например, нативную AAV TR последовательность можно изменить путем вставки, делеции, замены, усечения и/или миссенс-мутаций), при условии, что концевой повтор опосредует требуемые функции, например, репликацию, упаковывание вируса, встраивание и/или спасение провируса и тому подобное.

Вирусные векторы согласно раскрытию могут кроме того представлять собой «таргетирующие» вирусные векторы (например, имеющие направленный тропизм) и/или «гибридный» парвовирус (т.е. у которых вирусные TR и вирусный капсид происходят из разных парвовирусов), как описано в международной патентной публикации WO 00/28004 и Chao с соавт. (2000) Молекулярная Therapy 2:619.

Вирусные векторы согласно раскрытию кроме того могут представлять собой дуплексные частицы парвовируса, как описано в международной патентной публикации WO 01/92551 (раскрытие которой полностью включено в настоящее описание посредством ссылки). Таким образом, согласно некоторым вариантам осуществления двуспиральные (дуплексные) геномы можно упаковать в капсиды вирусов согласно раскрытию.

Кроме того, капсид или геномные элементы вируса могут содержать другие модификации, включая вставки, делеции и/или замены.

В рамках настоящего изобретения термин «аминокислота» охватывает любую существующую в природе аминокислоту, ее модифицированные формы и синтетические аминокислоты.

Существующие в природе левовращающие (L-) аминокислоты показаны в таблице 3.

Кроме того, несуществующей в природе аминокислотой может быть «ненатуральная» аминокислота, как описано у Wang с соавт. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 35:225–49 (2006)). Эти ненатуральные аминокислоты преимущественно можно использовать для химического связывания интересующих молекул с капсидным белком AAV.

Модифицированные капсидные белки AAV и Капсиды вирусов и Содержащие их вирусные векторы.

Изобретение относится к капсидным белкам AAV, содержащим мутацию (т.е., модификацию, которой может быть замена или вставка, или делеция) в аминокислотной

последовательности, и капсидам вирусов и вирусным векторам, содержащим модифицированный капсидный белок AAV. Мутантные капсидные белки AAV и кодирующие их нуклеиновые кислоты не обнаружены в природе (т.е., не являются натуральными) и не имеют ни последовательности из последовательностей дикого типа, обнаруженные в природе, ни функции этих последовательностей. Вместо этого, авторы изобретения обнаружили, что описанные в настоящем изобретении модификации положений аминокислот могут придавать вирусным векторам, содержащим модифицированный капсидный белок AAV, одно или более требуемых свойств, включая без ограничения: (i) селективную трансдукцию нейронных клеток после преодоления гематоэнцефалического барьера после системной инъекции; (ii) одновременную трансдукцию сердечной ткани и нейрональной ткани после системной инъекции; и (iii) ненацеливание на печень, селезенку, почки и другие периферические органы.

Согласно отдельным вариантам осуществления модифицированный капсидный белок AAV согласно раскрытию содержит одну или более мутаций (т.е. Модификаций) в аминокислотной последовательности нативного AAV1 капсидного белка или соответствующего аминокислотного остатка (остатков) капсидного белка из другого AAV серотипа, включая, но без ограничения AAV2, AAV3, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9 и AAVrh.10. Положения аминокислот в других AAV серотипах или модифицированных капсид AAV<sub>x</sub>, которые «соответствуют» этим положениям в нативном AAV1 капсидном белке, будут понятны специалистам в данной области, и их можно легко определить с использованием методик выравнивания последовательностей (см. Например, Фиг. 7 WO 2006/066066) и/или анализ кристаллической структуры (Padron с соавт. (2005) J. Virol. 79:5047–58).

Специалистам в данной области будет понятно, что для некоторых капсидных белков AAV соответствующей модификацией будет вставка и/или замена, в зависимости от того, частично или полностью соответствующие положения аминокислот присутствуют в вирусе или, альтернативно, полностью отсутствуют. Также, при модификации AAV, отличающейся от AAV1, конкретное положение (положения) аминокислот могут быть иными, чем положение в AAV1 (при использовании нумерации VP1. Как обсуждалась в другом месте в настоящем изобретении, соответствующее положение (положения) аминокислот будет легко понятно специалистам в данной области при использовании хорошо известных методик.

В рамках настоящего изобретения «мутация» или «модификация» в аминокислотной последовательности включает замены, вставки и/или делеции, каждая из которых может содержать одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или более аминокислот. Согласно отдельным вариантам осуществления модификация представляет собой замену. Согласно другим вариантам осуществления модификация представляет собой вставку (например, одного аминокислотного остатка между двумя аминокислотными остатками в аминокислотной последовательности).

Таким образом, согласно одному варианту осуществления изобретение относится к

капсидному белку аденоассоциированного вируса (AAV), причем капсидный белок AAV содержит, состоит по существу из или состоит из модификации в аминокислотных остатках S262, A263, S264, T265, A267 и S268 и одной вставки аминокислотного остатка между остатками 266 и 267 (нумерация VP1), причем нумерация каждого остатка основана на аминокислотной последовательности AAV1 (SEQ ID NO:1) или эквивалентном аминокислотном остатке в AAV2 (SEQ ID NO:2), AAV3 (SEQ ID NO:3), AAV6 (SEQ ID NO:4), AAV7 (SEQ ID NO:5), AAV8 (SEQ ID NO:6), AAV9 (SEQ ID NO:7) или AAVrh10 (SEQ ID NO:8). Согласно некоторым вариантам осуществления капсидный белок AAV может содержать модификацию в аминокислотном остатке H272. Согласно отдельным вариантам осуществления модификацией является S262N, A263G, S264T, T265S, A267S, S268T, H272T и их комбинация. Согласно отдельным вариантам осуществления одной вставкой аминокислотного остатка между остатками 266 и 267 является G (обозначено–267G).

Согласно некоторым вариантам осуществления описанный выше капсидный белок AAV может дополнительно содержать, по существу состоять из или состоять из модификации в аминокислотных остатках Q148, E152, S157, T162, H272, T326, D328, V330, T331, V341 и S345 и одной вставки аминокислотного остатка между остатками 152 и 153 (нумерация VP1), причем нумерация каждого остатка основана на аминокислотной последовательности SEQ ID NO:1 или эквивалентном аминокислотном остатке в SEQ ID NO:2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8. Согласно отдельным вариантам осуществления модификацией является Q148P, E152R, S157T, T162K, H272T, T326Q, D328E, V330T, T331K, V341I и S345T. Согласно отдельным вариантам осуществления одной вставкой аминокислотного остатка между остатками 152 и 153 является S (обозначено–153S).

Согласно некоторым вариантам осуществления описанный выше капсидный белок AAV может дополнительно содержать, по существу состоять из или состоять из модификации аминокислотных остатков L188, S205, N223, A224 и H272 (нумерация VP1), причем нумерация каждого остатка основана на аминокислотной последовательности SEQ ID NO:1 или эквивалентном аминокислотном остатке в SEQ ID NO:2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8. Согласно отдельным вариантам осуществления модификацией является L188I, S205A, N223S, A224S, и H272T.

Согласно некоторым вариантам осуществления изобретение относится к капсидному белку аденоассоциированного вируса (AAV), причем капсидный белок AAV содержит, состоит по существу из или состоит из модификации в аминокислотных остатках S262, A263, S264, T265 и A267 (нумерация VP1) и одной вставки аминокислотного остатка между остатками S268 и N269, причем нумерация каждого остатка основана на аминокислотной последовательности AAV1 (SEQ ID NO:1) или эквивалентном аминокислотном остатке в AAV2 (SEQ ID NO:2), AAV3 (SEQ ID NO:3), AAV6 (SEQ ID NO:4), AAV7 (SEQ ID NO:5), AAV8 (SEQ ID NO:6), AAV9 (SEQ ID NO:7) или AAVrh10 (SEQ ID NO:8). Согласно некоторым вариантам осуществления модификация представляет собой по меньшей мере одно из S262N, A263G, S264T, T265S

и A267S. Согласно некоторым вариантам осуществления капсид AAV может дополнительно содержать, по существу состоять из или состоять из модификации в аминокислотном остатке H272. Согласно некоторым вариантам осуществления капсидный белок AAV может дополнительно содержать, по существу состоять из или состоять из модификации в аминокислотных остатках Q148, E152, S157, T162, H272, T326, D328, V330, T331, V341 и S345 и одной вставки аминокислотного остатка между остатками E152 и P153. Согласно некоторым вариантам осуществления капсидный белок AAV дополнительно содержит модификацию в аминокислотных остатках L188, S205, N223, A224 и H272. Согласно некоторым вариантам осуществления модификация представляет собой по меньшей мере одно из L188I, S205A, N223S, A224S и H272T. Согласно некоторым вариантам осуществления вставкой аминокислотного остатка между остатками S268 и N269 является вставка одного T остатка. Согласно некоторым вариантам осуществления вставкой аминокислотного остатка между остатками E152 и P153 является вставка одного S остатка.

Согласно некоторым вариантам осуществления изобретение относится к капсидному белку аденоассоциированного вируса (AAV), причем капсидный белок AAV содержит, состоит из или состоит по существу из модификации, которая приводит к аминокислотной последовательности:  $X^1-X^2-X^3-X^4$  (SEQ ID NO:35) в аминокислотах, соответствующей положениям аминокислот 262–265 (нумерация VP1) нативного AAV1 капсидного белка (SEQ ID NO: 1), причем  $X^1$  представляет собой любую аминокислоту, не являющуюся S; причем  $X^2$  представляет собой любую аминокислоту, не являющуюся A; причем  $X^3$  представляет собой любую аминокислоту, не являющуюся S; и при этом  $X^4$  представляет собой любую аминокислоту, не являющуюся T. 45. Согласно некоторым вариантам осуществления аминокислотой  $X^1$  является N, аминокислотой  $X^2$  является G, аминокислотой  $X^3$  является T или аминокислотой  $X^4$  является S. Согласно некоторым вариантам осуществления аминокислотой  $X^1$  является N, аминокислотой  $X^2$  является G, аминокислотой  $X^3$  является T, а аминокислотой  $X^4$  является S. Согласно некоторым вариантам осуществления капсидный белок AAV дополнительно содержит модификацию в аминокислотном остатке H272. Согласно некоторым вариантам осуществления модификацией является H272T. Согласно некоторым вариантам осуществления капсидный белок AAV дополнительно содержит вставку аминокислотного остатка между аминокислотными остатками S268 и N269. Согласно некоторым вариантам осуществления вставкой аминокислотного остатка является вставка одного T остатка.

Согласно некоторым вариантам осуществления изобретение относится к капсидному белку аденоассоциированного вируса (AAV), причем капсидный белок AAV содержит, состоит по существу из или состоит из модификации в аминокислотных остатках S262, A263, S264, T265, A267 и H272 и одной вставки аминокислотного остатка между остатками S268 и N269, (нумерация VP1), причем нумерация каждого остатка основана на аминокислотной последовательности AAV1 (SEQ ID NO:2) или эквивалентном аминокислотном остатке в AAV1 (SEQ ID NO:1), AAV3 (SEQ ID NO:3),



AAV6 (SEQ ID NO:4), AAV7 (SEQ ID NO:5), AAV8 (SEQ ID NO:6), AAV9 (SEQ ID NO:7) или AAVrh10 (SEQ ID NO:8). Согласно некоторым вариантам осуществления модификация содержит по меньшей мере один из S262N, A263G, S264T, T265S, A267G и H272T. Согласно некоторым вариантам осуществления вставкой натурального одного аминокислотного остатка между остатками S268 и N269 является вставка одного T остатка.

Согласно некоторым вариантам осуществления изобретение относится к капсидному белку аденоассоциированного вируса (AAV), причем капсидный белок AAV содержит, состоит по существу из или состоит из модификации в аминокислотных остатках S262, Q263, S264, A266, S267 и H271 и вставки по меньшей мере одного аминокислотного остатка между остатками S261 и S262, (нумерация VP1), причем нумерация каждого остатка основана на аминокислотной последовательности AAV2 (SEQ ID NO:2) или эквивалентном аминокислотном остатке в AAV1 (SEQ ID NO:1), AAV3 (SEQ ID NO:3), AAV6 (SEQ ID NO:4), AAV7 (SEQ ID NO:5), AAV8 (SEQ ID NO:6), AAV9 (SEQ ID NO:7) или AAVrh10 (SEQ ID NO:8). Согласно некоторым вариантам осуществления модификация содержит по меньшей мере один из S262T, Q263S, S264G, A266S, S267T и H271T. Согласно некоторым вариантам осуществления вставкой между остатками SS61 и S262 является вставка одного аминокислотного остатка. Согласно некоторым вариантам осуществления вставкой между остатками S251 и S252 является вставка более чем одного аминокислотного остатка. Согласно некоторым вариантам осуществления вставкой между остатками S251 и S252 является вставка остатка N и G.

Согласно некоторым вариантам осуществления изобретение относится к капсидному белку аденоассоциированного вируса (AAV), причем капсидный белок AAV содержит, состоит по существу из или состоит из модификации в аминокислотных остатках S262, Q263, S264, A266, A267, H271 и одной вставки аминокислотного остатка между остатками S261 и S262, причем нумерация каждого остатка основана на аминокислотной последовательности AAV3 (SEQ ID NO:3) или эквивалентном аминокислотном остатке в AAV1 (SEQ ID NO:1), AAV2 (SEQ ID NO:2), AAV6 (SEQ ID NO:4), AAV7 (SEQ ID NO:5), AAV8 (SEQ ID NO:6), AAV9 (SEQ ID NO:7) или AAVrh10 (SEQ ID NO:8). Согласно некоторым вариантам осуществления модификация содержит по меньшей мере один из S262T, Q263S, S264G, A266S, A267T, H271T. Согласно некоторым вариантам осуществления вставкой между остатками SS61 и S262 является вставка одного аминокислотного остатка или более чем одного аминокислотного остатка. Согласно некоторым вариантам осуществления вставкой между остатками S251 и S252 является вставка остатка N и G.

Согласно некоторым вариантам осуществления изобретение относится к капсидному белку аденоассоциированного вируса (AAV), причем капсидный белок AAV содержит, состоит по существу из или состоит из модификации в аминокислотных остатках S263, S269, A237 (нумерация VP1), причем нумерация каждого остатка основана на аминокислотной последовательности AAV9 (SEQ ID NO:9) или эквивалентном

аминокислотном остатке в AAV1 (SEQ ID NO: 1), AAV2 (SEQ ID NO:2), AAV3 (SEQ ID NO:3), AAV6 (SEQ ID NO:4), AAV7 (SEQ ID NO:5), AAV8 (SEQ ID NO:6) или AAVrh10 (SEQ ID NO:8). Согласно некоторым вариантам осуществления модификация содержит по меньшей мере один из S263G, S269T и A273T.

Согласно некоторым вариантам осуществления изобретение относится к капсидному белку аденоассоциированного вируса (AAV), причем капсидный белок AAV содержит, состоит по существу из или состоит из последовательности согласно любой одной из SEQ ID NO: 9–SEQ ID NO: 34.

Неограничивающие примеры модификаций для получения капсидных белков согласно настоящему раскрытию в серотипах AAV 1, 2, 3, 6, 7, 8 и 9, соответственно, показаны в таблице 2, в которой идентифицированы эквивалентные аминокислотные остатки в соответствующих AAV серотипах.

Согласно дополнительным вариантам осуществления капсидные белки согласно настоящему раскрытию могут содержать, по существу состоять из или состоять из: аминокислотной последовательности SEQ ID NO:9 (AAV1RX); аминокислотной последовательности SEQ ID NO:10 (AAV2RX); аминокислотной последовательности SEQ ID NO:11 (AAV3RX); аминокислотной последовательности SEQ ID NO:12 (AAV6RX); аминокислотной последовательности SEQ ID NO:13 (AAV7RX); аминокислотной последовательности SEQ ID NO:14 (AAV8RX); аминокислотной последовательности SEQ ID NO:15 (AAV9RX); аминокислотной последовательности SEQ ID NO:16 (AAV1R6); аминокислотной последовательности SEQ ID NO:17 (AAV2R6); аминокислотной последовательности SEQ ID NO:18 (AAV3R6); аминокислотной последовательности SEQ ID NO:19 (AAV6R6); аминокислотной последовательности SEQ ID NO:20 (AAV7R6); аминокислотной последовательности SEQ ID NO:21 (AAV8R6); аминокислотной последовательности SEQ ID NO:22 (AAV9R6); аминокислотной последовательности SEQ ID NO:23 (AAV1R7); аминокислотной последовательности SEQ ID NO:24 (AAV2R7); аминокислотной последовательности SEQ ID NO:25 (AAV3R7); аминокислотной последовательности SEQ ID NO:26 (AAV6R7); аминокислотной последовательности SEQ ID NO:27 (AAV7R7); аминокислотной последовательности SEQ ID NO:28 (AAV8R7); и аминокислотной последовательности SEQ ID NO:29 (AAV9R7). Согласно одному варианту осуществления капсидный белок согласно настоящему раскрытию имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO:9 (AAV1RX). Согласно одному варианту осуществления капсидный белок согласно настоящему раскрытию имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO:16 (AAV1R6). Согласно одному варианту осуществления капсидный белок согласно настоящему раскрытию имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO:23 (AAV1R7).

Согласно некоторым вариантам осуществления изобретение относится к капсидным белкам AAV, имеющим по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 99%, включая все диапазоны и поддиапазоны между ними, идентичность последовательностей к аминокислотной

последовательности SEQ ID NO:9 (AAV1RX); аминокислотной последовательности SEQ ID NO:10 (AAV2RX); аминокислотной последовательности SEQ ID NO:11 (AAV3RX); аминокислотной последовательности SEQ ID NO:12 (AAV6RX); аминокислотной последовательности SEQ ID NO:13 (AAV7RX); аминокислотной последовательности SEQ ID NO:14 (AAV8RX); и аминокислотной последовательности SEQ ID NO:15 (AAV9RX).

Согласно некоторым вариантам осуществления изобретение относится к капсидным белкам AAV, имеющим по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 99%, включая все диапазоны и поддиапазоны между ними, идентичность последовательностей к аминокислотной последовательности SEQ ID NO:16 (AAV1R6); аминокислотной последовательности SEQ ID NO:17 (AAV2R6); аминокислотной последовательности SEQ ID NO:18 (AAV3R6); аминокислотной последовательности SEQ ID NO:19 (AAV6R6); аминокислотной последовательности SEQ ID NO:20 (AAV7R6); аминокислотной последовательности SEQ ID NO:21 (AAV8R6); аминокислотной последовательности SEQ ID NO:22 (AAV9R6).

Согласно некоторым вариантам осуществления изобретение относится к капсидному белку AAV, имеющему по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 99%, включая все диапазоны и поддиапазоны между ними, идентичность последовательностей к аминокислотной последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO:23 (AAV1R7); аминокислотной последовательности SEQ ID NO:24 (AAV2R7); аминокислотной последовательности SEQ ID NO:25 (AAV3R7); аминокислотной последовательности SEQ ID NO:26 (AAV6R7); аминокислотной последовательности SEQ ID NO:27 (AAV7R7); аминокислотной последовательности SEQ ID NO:28 (AAV8R7); и аминокислотной последовательности SEQ ID NO:29 (AAV9R7).

Настоящее изобретение также относится к капсидному белку аденоассоциированного вируса (AAV), причем капсидный белок AAV содержит одну или более замен во всех положениях или в любой комбинации меньшего количества, чем все положения, что приводит к аминокислотной последовательности:  $X^1-X^2-X^3-X^4$  (SEQ ID NO: 35). Согласно некоторым вариантам осуществления модификация аминокислотной последовательности:  $X^1-X^2-X^3-X^4$  находится в аминокислотах, соответствующих положениям аминокислот 262–265 (нумерация VP1) нативного AAV1 капсидного белка (SEQ ID NO: 1). Согласно некоторым вариантам осуществления  $X^1$  может быть любая аминокислота, не являющаяся S. Согласно некоторым вариантам осуществления  $X^2$  может быть любая аминокислота, не являющаяся A. Согласно некоторым вариантам осуществления  $X^3$  может быть любая аминокислота, не являющаяся S. Согласно некоторым вариантам осуществления  $X^4$  может быть любая аминокислота, не являющаяся T. Согласно одному варианту осуществления аминокислотой  $X^1$  является N. Согласно одному варианту осуществления аминокислотой  $X^2$  является G. Согласно одному варианту осуществления аминокислотой  $X^3$  является T. Согласно одному варианту осуществления аминокислотой  $X^4$  является S. Согласно другому варианту осуществления

$X^1$  является N,  $X^2$  является G,  $X^3$  является T, а  $X^4$  является S. Согласно некоторым вариантам осуществления одна из  $X^1$ – $X^4$  не замещена, а аминокислотным остатком в незамещенном положении является аминокислотный остаток дикого типа.

Примеры аминокислотных остатков, которые можно заменить на нативную аминокислоту в соответствующих положениях, описанных в настоящем изобретении, изложены в таблице 3.

Должно быть понятно, что замены и вставки, описанные в капсидных белках AAV, согласно настоящему раскрытию, могут включать замены и/или вставки консервативных аминокислотных остатков. Такие консервативные замены хорошо известны в данной области и включают, например, неполярные аминокислоты Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Met, Phe, Trp и Pro, которые можно заменить друг на друга; полярные аминокислоты Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn и Gln, которые можно заменить друг на друга; отрицательно заряженные аминокислоты Asp и Glu, которые можно заменить друг на друга; и положительно заряженные аминокислоты Lys, Arg и His, которые можно заменить друг на друга, в любой комбинации.

Настоящее изобретение также относится к капсиду AAV, содержащему капсидный белок согласно настоящему раскрытию, а также вирусному вектору, содержащему капсид AAV согласно настоящему раскрытию. Согласно некоторым вариантам осуществления вирусный вектор может содержать, по существу состоять из или состоять из вирусного вектора, содержащего: капсид AAV согласно настоящему раскрытию; и молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую по меньшей мере одну концевую повторяющуюся последовательность, причем нуклеиновая кислота заключена в капсид AAV. Согласно некоторым вариантам осуществления концевым повтором является концевой повтор AAV. Согласно некоторым вариантам осуществления концевым повтором является концевой повтор не AAV.

Также настоящее изобретение относится к композиции, содержащей капсидный белок и/или вирусный вектор согласно настоящему раскрытию в фармацевтически приемлемом носителе.

Настоящее изобретение также относится к нескольким способам, включая способ введения в клетку молекулы нуклеиновой кислоты, включающий введение клетки в контакт с вирусным вектором и/или композицией согласно настоящему раскрытию, например, в условиях, в которых клетка забирает или интрениализирует вирусный вектор, а молекула нуклеиновой кислоты, вводимая вирусным вектором, экспрессируется в клетке.

Также настоящее изобретение относится к способу доставки пациенту молекулы нуклеиновой кислоты, включающему введение пациенту вирусного вектора и/или композиции согласно настоящему раскрытию. Согласно отдельным вариантам осуществления вирусный вектор и/или композицию вводят в центральную нервную систему пациента. Согласно отдельным вариантам осуществления вирусный вектор и/или композицию доставляют через гематоэнцефалический барьер.

Согласно некоторым вариантам осуществления вирусный вектор согласно

настоящему раскрытию может содержать интересующую молекулу нуклеиновой кислоты. Согласно некоторым вариантам осуществления интересующая молекула нуклеиновой кислоты может кодировать терапевтический белок или терапевтическую молекулу РНК.

Настоящее изобретение также относится к способу выборочной доставки интересующей молекулы нуклеиновой кислоты в нейронную клетку, включающему введение нейронной клетки в контакт с вирусным вектором согласно настоящему раскрытию, причем вирусный вектор содержит интересующую молекулу нуклеиновой кислоты. Согласно дополнительным вариантам осуществления способ может дополнительно включать выборочную доставку интересующей молекулы нуклеиновой кислоты в кардиомиоцит, например, когда способ выполняют для пациента (например, пациент–человека). Согласно некоторым вариантам осуществления композицию выборочно доставляют в нейронную клетку. Согласно некоторым вариантам осуществления композицию выборочно доставляют в кардиомиоцит.

Согласно дополнительным вариантам осуществления изобретение относится к способу лечения неврологического расстройства или нарушения у пациента, включающему введение пациенту вирусного вектора согласно настоящему раскрытию, причем вирусный вектор содержит молекулу нуклеиновой кислоты, которая кодирует терапевтический белок или терапевтическую РНК, эффективную при лечении неврологического расстройства или нарушения.

Дополнительно настоящее изобретение относится к способу лечения неврологического и сердечно–сосудистого расстройства или нарушения у пациента, включающему введение пациенту вирусного вектора согласно настоящему раскрытию, причем вирусный вектор содержит молекулу нуклеиновой кислоты, которая кодирует терапевтический белок или терапевтическую РНК, эффективную при лечении неврологического и кардиологического расстройства или нарушения.

В описанных в настоящем изобретении способах вирусный вектор и/или композицию согласно настоящему раскрытию можно вводить/доставлять пациенту согласно настоящему раскрытию посредством системного способа введения (например, внутривенно, внутриартериально, внутрибрюшинно и т.д.). Согласно некоторым вариантам осуществления вирусный вектор и/или композицию можно вводить пациенту посредством интрацеребровентрикулярного, интрацистерального, интрапаренхиматозного, внутричерепного и/или внутрибололочного пути введения.

Согласно некоторым вариантам осуществления системное введение вирусного вектора и/или композиции пациенту приводит к понижению трансдукции в не являющихся мишенями тканях (например, не являющихся центральной нервной системой). Согласно некоторым вариантам осуществления в настоящем раскрытии вирусный вектор не нацелен на селезенку, печень и/или почки. Согласно некоторым вариантам осуществления вирусный вектор не нацелен на спленоциты, гепатоциты и/или клетки почки. Согласно некоторым вариантам осуществления вирусный вектор трансдуцирует печень, селезенку и/или почки на уровне, который уменьшен по меньшей

мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% по сравнению с трансдукцией посредством AAVrh.10, в котором вирусная трансдукция необязательно определяется люциферазой или экспрессией GFP. Предпочтительно, вирусный вектор трансдуцирует печень, селезенку и/или почки на уровне, который уменьшен по меньшей мере на 50%–100% или 80–90% по сравнению с трансдукцией посредством AAVrh.10, причем вирусная трансдукция необязательно определяется люциферазой или экспрессией GFP.

Согласно некоторым вариантам осуществления вирусный вектор трансдуцирует головной мозг на уровне, который увеличен по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% по сравнению с трансдукцией посредством AAV1, причем вирусная трансдукция необязательно определяется люциферазой или экспрессией GFP. Предпочтительно, вирусный вектор трансдуцирует головной мозг на уровне, который увеличен по меньшей мере в 2 раза, в 2,5 раза, в 3 раза, в 4 раза, в 4,5 раза, в 5 раз, в 5,5 раз, в 6 раз, в 6,5 раз, в 7 раз, в 7,5 раз, в 8 раз, в 8,5 раз, в 9 раз, в 9,5 раз или в 10 раз по сравнению с трансдукцией посредством AAV1, причем вирусная трансдукция необязательно определяется люциферазой или экспрессией GFP. Согласно некоторым вариантам осуществления вирусный вектор выборочно трансдуцирует нейроны.

В раскрытии предусмотрено, что модифицированные капсидные белки согласно раскрытию можно получать посредством модификации капсидного белка любого AAV, известного теперь или открытого позже. Кроме того, капсидным белком AAV, который необходимо модифицировать, может быть существующий в природе капсидный белок AAV (например, AAV2, AAV3a или 3b, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAVrh.10 или любой из серотипов AAV, показанных в таблице 1), но без ограничения. Специалистам в данной области будет понятно, что в данной области известно множество манипуляций с капсидными белками AAV, и раскрытие не ограничено модификациями существующих в природе капсидных белков AAV. Например, подлежащий модификации капсидный белок уже может иметь модификации по сравнению с существующим в природе AAV (например, получен из существующего в природе капсидного белка AAV, например, AAV2, AAV3a, AAV3b, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11 и/или AAV12 или любого другого AAV, известного теперь или открытого позже). Такие капсидные белки AAV также находятся в пределах объема настоящего раскрытия.

Таким образом, согласно отдельным вариантам осуществления подлежащий модификации капсидный белок AAV может быть получен из существующего в природе AAV, но может дополнительно содержать одну или более чужеродных последовательностей (например, которые являются экзогенными для нативного вируса), которые вставляют и/или заменяют в капсидном белке и/или были изменены путем делеции одной или более аминокислот.

Соответственно, при ссылке в настоящем изобретении на конкретный капсидный белок AAV (например, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9,

AAV10, AAV11 или AAV12 капсидный белок или капсидный белок любого из серотипов AAV, показанных в таблице 1, и т.д.), предполагается охват нативного капсидного белка, а также капсидных белков, которые имеют иные изменения, чем модификации согласно раскрытию. Такие изменения включают замены, вставки и/или делеции. Согласно отдельным вариантам осуществления капсидный белок может содержать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20, меньше чем 20, меньше чем 30, меньше чем 40 меньше чем 50, меньше чем 60 или меньше чем 70 вставленных в него аминокислот (иных чем вставки согласно настоящему раскрытию) по сравнению с последовательностью нативного капсидного белка AAV. Согласно вариантам осуществления раскрытия капсидный белок может содержать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20, меньше чем 20, меньше чем 30, меньше чем 40 меньше чем 50, меньше чем 60 или меньше чем 70 аминокислотных замен (иных чем аминокислотные замены согласно настоящему изобретению) по сравнению с последовательностью нативного капсидного белка AAV. Согласно вариантам осуществления капсидный белок может содержать делецию 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20, меньше чем 20, меньше чем 30, меньше чем 40 меньше чем 50, меньше чем 60 или меньше чем 70 аминокислот (иных чем аминокислотные делеции согласно раскрытию) по сравнению с последовательностью нативного капсидного белка AAV.

Согласно отдельным вариантам осуществления капсидный белок AAV имеет последовательность нативного капсидного белка AAV или имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 90%, 95%, 97%, 98% или 99% аналогична или идентична последовательности нативного капсидного белка AAV. Например, согласно отдельным вариантам осуществления AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12 и т.д. Капсидный белок охватывает последовательность нативного AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12 капсидного белка, а также последовательности, которые по меньшей мере приблизительно на 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% аналогичны или идентичны последовательности нативного AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12 капсидного белка.

В данной области известны способы определения сходства или идентичности последовательностей между двумя или более аминокислотными последовательностями. Сходство или идентичность последовательностей можно определить с использованием стандартных методов, известных в данной области, включая, но без ограничения, алгоритм локальной идентичности последовательностей Смита–Уотермана, *Adv. Appl. Math.* 2, 482 (1981), с помощью алгоритм выравнивания идентичности последовательностей Нидлмана–Вунша *J. Mol. Biol.* 48,443 (1970), с помощью способа поиска сходства по Пирсону–Липману, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85,2444 (1988), с помощью компьютеризированных методов реализации этих алгоритмов (GAP, BESTFIT,

FASTA и TFASTA в пакете программного обеспечения Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, WI), программу последовательностей Best Fit, описанную Devereux с соавт. Nucl. Acid Res. 12, 387–395 (1984), или посредством контроля.

Другим подходящим алгоритмом является алгоритм BLAST, описанный у Altschul et al. J. Mol. Biol. 215, 403–410, (1990) и Karlin et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 5873–5787 (1993). Особенно полезной программой BLAST является программа WU-BLAST-2, которая была получена из Altschul et al. Methods in Enzymology, 266, 460–480 (1996); [http://blast.wustl.edu/blast/ README.html](http://blast.wustl.edu/blast/README.html). В WU-BLAST-2 используют несколько параметров поиска, которые по выбору устанавливают как значения по умолчанию.

Кроме того, дополнительным полезным алгоритмом является Gapped BLAST по сообщению Altschul с соавт. (1997) Nucleic Acids Res. 25, 3389–3402.

Модифицированные капсиды вирусов можно использовать в качестве «капсидных носителей», как было описано, например, в патенте США № 5863541. Молекулы, которые можно упаковывать с помощью модифицированного капсида вирусов и переносить в клетку, включают гетерологичную ДНК, РНК, полипептиды, небольшие органические молекулы, металлы или их комбинации.

Гетерологичные молекулы определяют, как молекулы, которые не встречаются в природе при инфекции AAV, например, они не кодируются геномом AAV дикого типа. Кроме того, терапевтически полезные молекулы можно связать с внешней частью капсида химерного вируса для переноса молекул в клетки-мишени хозяина. Такие связанные молекулы могут содержать ДНК, РНК, небольшие органические молекулы, металлы, углеводороды, липиды и/или полипептиды. В одном варианте осуществления согласно раскрытию терапевтически полезную молекулу ковалентно связывают (т.е. конъюгируют или химически соединяют) с капсидными белками. Специалистам в данной области известны способы ковалентного связывания молекул.

Модифицированные капсиды вирусов согласно раскрытию также находят применение в качестве матриц для дополнительной модификации антигенности, чтобы избежать нейтрализующих антител в сыворотке любых млекопитающих, как описано, например, в заявке РСТ № РСТ/2016/054143.

Модифицированные капсиды вирусов согласно раскрытию также находят применение при получении антител против новых капсидных структур. В качестве дополнительной альтернативы, экзогенную аминокислотную последовательность можно вставить в модифицированный капсид вируса для презентации антигена в клетку, например, для введения пациенту для получения иммунного ответа на экзогенную аминокислотную последовательность.

Согласно другим вариантам осуществления капсиды вирусов можно вводить для блокирования некоторых клеточных сайтов перед и/или одновременно (например, в течение минут или часов друг от друга) с введением вирусного вектора, доставляющего молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие интересующий полипептид, пептид и/или



функциональную РНК. Например, согласно изобретению капсиды можно доставить для блокирования клеточных рецепторов на конкретных клетках, а после этого или одновременно можно вводить вектор доставки, который может уменьшать трансдукцию блокированных клеток и улучшать трансдукцию других мишеней.

Согласно типичным вариантам осуществления модифицированные капсиды вирусов можно вводить пациенту перед и/или одновременно с модифицированным вирусным вектором согласно настоящему раскрытию. Кроме того, изобретение относится к композициям и фармацевтическим готовым формам, содержащим модифицированные капсиды вирусов согласно изобретению; необязательно, композиция также содержит модифицированные вирусный вектор согласно раскрытию.

Изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты (необязательно, выделенные молекулы нуклеиновой кислоты), кодирующим модифицированные капсиды вирусов и капсидные белки согласно раскрытию. Кроме того, изобретение относится к векторам, содержащим молекулы нуклеиновой кислоты, и клеткам (*in vivo* или *in culture*), содержащим молекулы нуклеиновой кислоты и/или векторы согласно раскрытию. Подходящие векторы включают без ограничения вирусные векторы (например, аденовирус, AAV, герпесвирус, альфавирус, вирус коровьей оспы, поксвирусы, бакуловирусы и тому подобное), плазмиды, фаги, YAC, BAC и тому подобное. Такие молекулы нуклеиновой кислоты, векторы и клетки можно использовать, например, в качестве реагентов (например, вспомогательных пакующих конструкций или пакующих клеток) для получения модифицированных капсидов вирусов или вирусных векторов, как описано в настоящем изобретении.

Капсиды вирусов согласно раскрытию можно получать с использованием любого способа, известного в данной области, например, посредством экспрессии из бакуловируса (Brown с соавт. (1994) *Virology* 198:477–488).

Модификации капсидного белка AAV согласно настоящему раскрытию представляют собой «селективные» модификации. Этот подход отличается от предыдущей работы с заменами всей субъединицы или больших доменов между серотипами AAV (см. Например, международную патентную публикацию WO 00/28004; Nauck с соавт. (2003) *J. Virology* 77:2768–2774; Shen с соавт. (2007) *Mol Ther.* 15(11):1955–62; и Mays с соавт. (2013) *J Virol.* 87(17):9473–85). Капсидные белки AAV согласно настоящему раскрытию, насколько известно авторам изобретения, являются первыми примерами специфических изменений аминокислот, обеспечивающих преодоление гематоэнцефалического барьера.

Согласно некоторым вариантам осуществления капсидный белок AAV содержит специфические замены аминокислот, которые обеспечивают преодоление гематоэнцефалического барьера. Согласно некоторым вариантам осуществления капсидный белок AAV содержит замены 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 или 22 аминокислот, причем замещенные аминокислоты получают из AAVrh.10, при этом аминокислотные замены обеспечивают преодоление гематоэнцефалического барьера.

Согласно некоторым вариантам осуществления капсидный белок AAV получают из AAV1 капсидного белка, и он содержит замены 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 или 22 аминокислот, причем замещенные аминокислоты получают из AAVrh.10, при этом аминокислотные замены обеспечивают преодоление гематоэнцефалического барьера. Согласно некоторым вариантам осуществления конкретными аминокислотами, которые обеспечивают преодоление гематоэнцефалического барьера, являются 262N, 263G, 264T, 265S, 267G, 268S, 269T и 273T (нумерация VP1), причем нумерация каждого остатка основана на аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 30.

Согласно некоторым вариантам осуществления капсидный белок AAV содержит специфические замены аминокислот, которые обеспечивают ненацеливание на печень, почки и/или селезенку. Согласно некоторым вариантам осуществления капсидный белок AAV содержит замены 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 или 22 аминокислот, причем замещенные аминокислоты получают из AAVrh.10, при этом аминокислотные замены обеспечивают ненацеливание на печень, почки и/или селезенку. Согласно некоторым вариантам осуществления капсидный белок AAV получают из AAV1 капсидного белка, и он содержит 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 или 22 аминокислоты, причем замещенные аминокислоты получают из AAVrh.10, при этом аминокислотные замены обеспечивают ненацеливание на печень, почки и/или селезенку.

Согласно некоторым вариантам осуществления замещенные аминокислоты расположены в VR-I области капсида. Согласно некоторым вариантам осуществления замещенные аминокислоты расположены на поверхности капсида. Согласно некоторым вариантам осуществления замещенные аминокислоты расположены в основании выступов по оси симметрии 3 порядка капсида. Согласно некоторым вариантам осуществления замещенные аминокислоты расположены в углублении по оси симметрии 2 порядка капсида. Согласно некоторым вариантам осуществления замещенные аминокислоты расположены внутри VR-II области капсидного белка, внутри DE-петли. Согласно некоторым вариантам осуществления замещенные аминокислоты расположены внутри бета-цепи E капсида.

Согласно отдельным вариантам осуществления «селективная» модификация приводит к вставке и/или замене и/или делеции меньше чем около 20, 18, 15, 12, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 или 2 смежных аминокислот.

Модифицированные капсидные белки и капсиды согласно раскрытию могут дополнительно содержать любую другую модификацию, известную теперь или идентифицированную позже.

Например, капсидные белки AAV и капсиды вирусов согласно раскрытию могут быть химерными в том смысле, что они могут содержать всю или часть субъединицы капсида из другого вируса, необязательно другого парвовируса или другого AAV серотипа, например, как описано в международной патентной публикации WO 00/28004.

Капсид вируса может содержать нацеливающую последовательность (например, замещенную и/или вставленную в капсид вируса), которая направляет капсид вируса для

взаимодействия с молекулами поверхности клетки, присутствующими в требуемой ткани (тканях)–мишенях (см. Например, международную патентную публикацию WO 00/28004 и Nauck с соавт. (2003) *J. Virology* 77:2768–2774); Shi с соавт. *Human Gene Therapy* 17:353–361 (2006) [описывает вставку мотива RGD, связывающего рецептор интегрина в положениях 520 и/или 584 субъединицы капсид AAVa]; патент США № 7314912 [описывает вставку пептида P1, содержащего мотив RGD после положений аминокислот 447, 534, 573 и 587 AAV2 субъединицы капсида] и международную патентную публикацию № WO 2015038958 [описывает выборочное восстановление AAV векторов, содержащих пептидные последовательности, показывающие повышенную трансдукцию ЦНС]). В данной области известны другие положения внутри субъединицы капсид AAVa, которые допускают вставки (например, положения 449 и 588, описанные Grifman с соавт. *Молекулярная Therapy* 3:964–975 (2001)).

Например, некоторые из капсид вируса согласно раскрытию имеют относительно неэффективный тропизм в отношении большинства интересующих тканей–мишеней (например, печени, скелетных мышц, сердца, мышц диафрагмы, почки, головного мозга, желудка, кишечника, кожи, эндотелиальных клеток и/или легких). Преимущественно нацеливающую последовательность можно встраивать в эти векторы с низкой трансдукцией для придания таким образом капсиду вируса требуемого тропизма и, необязательно, выборочного тропизма к конкретной ткани (тканям). Капсидные белки AAV, капсиды и векторы, содержащие нацеливающие последовательности, описаны, например, в международной патентной публикации WO 00/28004. В качестве другой возможности одну или более несуществующих в природе аминокислот, как описано у Wang с соавт. (*Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 35:225–49 (2006)), можно встраивать в AAV субъединицу капсида в ортогональном сайте в качестве средства перенаправления вектора с низкой трансдукцией в требуемую ткань (ткани)–мишени. Эти ненатуральные аминокислоты преимущественно можно использовать для химического связывания интересующих молекул с капсидным белком AAV, включая без ограничения: гликаны (маннозу – нацеливание на дендритные клетки); RGD, бомбезин или нейропептид для направленной доставки в конкретные типы раковых клеток; РНК–аптамеры или пептиды, выбранные из фагового дисплея, нацеленные на конкретные рецепторы клеточной поверхности, такие как рецепторы фактора роста, интегрины и тому подобное. В данной области известны способы химической модификации аминокислот (см. Например, Greg T. Hermanson, Bioconjugate Techniques, 1<sup>st</sup> edition, Academic Press, 1996).

Согласно типовым вариантам осуществления нацеливающей последовательностью может быть последовательность капсида вируса (например, автономная последовательность капсида парвовируса, последовательность капсид AAVa или последовательность капсида любого другого вируса), которая направляет инфекцию в клетки конкретного типа (типов).

В качестве еще одного неограничивающего примера связывающий гепарин домен (например, связывающий гепарин домен респираторно синцитиального вируса) можно

вставить или заместить в субъединице капсида, которая обычно не связывает гепарансульфатные (HS) рецепторы (например, AAV 4, AAV5) для обеспечения связывания гепарина с полученным в результате мутантом.

В качестве еще одного неограничивающего примера области узнавания аминокислот, которые могут обеспечивать связывание с гликанами, такими как галактоза, сиаловая кислота, манноза, лактоза, сульфо-N-лактозамин, галактозамин, глюкоза, глюкозамин, фруктоза, фукоза, ганглиозиды, хитотриоза, хондроитинсульфат, кератинсульфат, дерматансульфат, можно пересадить на субъединицу капсида, которая обычно не связывает один или более перечисленных выше сахаров [например, патентная публикация США № US20160017005, озаглавленная *Methods and compositions for dual glycan binding AAV vectors*].

B19 инфицирует первичные клетки-предшественники эритроидов с использованием глобозида в качестве своего рецептора (Brown с соавт. (1993) *Science* 262:114). Структуру B19 определили с разрешением 8 Å (Agbandje-McKenna с соавт. (1994) *Virology* 203:106). область капсида B19, которая связывается с глобозидом, картировали между аминокислотами 399–406 (Chapman с соавт. (1993) *Virology* 194:419), петлевая область между β-бочкообразными структурами E и F (Chipman с соавт. (1996) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 93:7502). Соответственно, домен связывания рецептора глобозида капсида B19 можно заменить на капсидный белок AAV для нацеливания капсида вируса или содержащего его вирусного вектора на эритроидные клетки.

Согласно типовым вариантам осуществления экзогенной нацеливающей последовательностью может быть любая аминокислотная последовательность, кодирующая пептид, который изменяет тропизм капсида вируса или вирусного вектора, содержащего модифицированный капсидный белок AAV. Согласно отдельным вариантам осуществления нацеливающий пептид или белок может существовать в природе или альтернативно быть полностью или частично синтетическим. Иллюстративные нацеливающие последовательности содержат лиганды и другие пептиды, которые связываются с рецепторами клеточной поверхности и гликопротеинами, такими как RGD пептидные последовательности, брадикинин, гормоны, пептидные факторы роста (например, эпидермальный фактор роста, фактор роста нервов, фактор роста фибробластов, фактор роста тромбоцитов, инсулиноподобные факторы роста I и II и т.д.), цитокины, меланоцитстимулирующий гормон (например, α, β или γ), нейропептиды и эндорфины и тому подобное, и их фрагменты, которые сохраняют способность нацеливать клетки на их когнатные рецепторы. Другие иллюстративные пептиды и белки включают вещество P, фактор роста кератиноцитов, нейропептид Y, высвобождающий гастрин пептид, интерлейкин 2, лизоцим белка куриных яиц, эритропоэтин, гонадолиберин, кортикостатин, β-эндорфин, лей-энкефалин, риморфин, α-нео-энкефалин, ангиотензин, пневмадин, вазоактивный кишечный пептид, нейротензин, мотилин и их фрагменты, как описано выше. В качестве еще одной дополнительной альтернативы, связывающий домен из токсина (например, столбнячного токсина или

змеиных токсинов, таких как  $\alpha$ -бунгаротоксин и тому подобное) можно заместить на капсидный белок в виде нацеливающей последовательности. Согласно еще одному дополнительному типовому варианту осуществления капсидный белок AAV можно модифицировать путем замещения «неклассического» сигнального пептида импорта/экспорта (например, фактора роста фибробластов-1 и -2, интерлейкина 1, белка HIV-1 Tat, белка герпесвируса VP22 и тому подобное), как описано у Cleves (*Current Biology* 7:R318 (1997)) на капсидный белок AAV. Также включены пептидные мотивы, которые направляют поглощение конкретными клетками, например, пептидный мотив FVFLP запускает поглощение клетками печени.

Для идентификации пептидов, которые распознают любой интересующий тип клеток, можно использовать методы фагового дисплея, а также другие известные в данной области методы.

Нацеливающая последовательность может кодировать любой пептид, который нацеливает на сайт связывания клеточной поверхности, содержащий рецепторы (например, белок, углевод, гликопротеин или протеогликан). Примеры сайтов связывания клеточной поверхности включают, но без ограничения, гепарансульфат, хондроитинсульфат и другие гликозаминогликаны, фрагменты сиаловой кислоты, фрагменты полисиаловой кислоты, гликопротеины и ганглиозиды, гликопротеины МНС I, углеводные компоненты, находящиеся на мембранных гликопротеинах, включая маннозу, N-ацетил-галактозамин, N-ацетил-глюкозамин, фукозу, галактозу и тому подобное.

В качестве еще одной дополнительной альтернативы, нацеливающей последовательностью может быть пептид, который можно использовать для химического соединения (например, может содержать остатки аргинин и/или лизин, которые могут быть химически связаны через их R группы) с другой молекулой, которая нацелена на вход в клетку.

Описанные выше модификации можно встраивать в капсидные белки или капсиды согласно раскрытию в комбинации друг с другом и/или с любой другой модификацией, известной теперь или открытой позже.

Раскрытие также охватывает вирусные векторы, содержащие модифицированные капсидные белки и капсиды согласно раскрытию. Согласно отдельным вариантам осуществления вирусный вектор представляет собой парвовирусный вектор (например, содержащий капсид парвовируса и/или геном вектора), например, AAV вектор (например, содержащий капсид AAV и/или геном вектора). Согласно типовым вариантам осуществления вирусный вектор содержит модифицированный капсид AAV, содержащий модифицированную субъединицу капсида согласно раскрытию и геном вектора.

Например, согласно типовым вариантам осуществления вирусный вектор содержит: (а) модифицированный капсид вируса (например, модифицированный капсид AAV) содержащий модифицированный капсидный белок согласно раскрытию; и (b) нуклеиновую кислоту, содержащую концевую повторяющуюся последовательность (например, AAV TR), причем нуклеиновая кислота, содержащая концевую

повторяющуюся последовательность, заключена в модифицированный капсид вируса. Нуклеиновая кислота необязательно может содержать два концевых повтора (например, два AAV TR).

Согласно типовым вариантам осуществления вирусный вектор представляет собой рекомбинантный вирусный вектор, содержащий гетерологичную молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующей интересующий белок или функциональную РНК. Рекомбинантные вирусные векторы описаны более подробно ниже.

Специалистам в данной области будет понятно, что модифицированные капсидные белки, капсиды вирусов и вирусные векторы согласно раскрытию исключают те капсидные белки, капсиды и вирусные векторы, которые имеют указанные аминокислоты в указанных положениях в их нативном состоянии (т.е. не мутанты).

#### Способы получения Вирусных векторов

Настоящее изобретение дополнительно относится к способам получения вирусных векторов согласно изобретению. В одном типовом варианте осуществления изобретение относится к способу получения вирусного вектора, причем способ включает введение в клетку: (а) матрицы нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность по меньшей мере одного TR (например, AAV TR последовательность), и (b) AAV последовательностей, достаточных для репликации матрицы нуклеиновой кислоты и капсидирования в капсиды AAV (например, AAV гер последовательностей и AAV сар последовательностей, кодирующих капсиды AAV согласно раскрытию). Необязательно, матрица нуклеиновой кислоты дополнительно содержит по меньшей мере одну последовательность гетерологичной нуклеиновой кислоты. Согласно отдельным вариантам осуществления матрица нуклеиновой кислоты содержит две AAV ITR последовательности, которые расположены 5' и 3' относительно гетерологичной последовательности нуклеиновой кислоты (если присутствуют), хотя нет необходимости, чтобы они были непосредственно смежными с ней.

Матрицу нуклеиновой кислоты и AAV гер и сар последовательности получают в таких условиях, чтобы в клетке получать вирусный вектор, содержащий матрицу нуклеиновой кислоты, упакованную внутри капсид AAVa. Способ может дополнительно включать стадию сбора вирусного вектора из клетки. Вирусный вектор можно собирать из среды и/или путем лизиса клеток.

Клеткой может быть клетка, которая допускает репликацию вируса AAV. Можно использовать любую подходящую клетку, известную в данной области. Согласно отдельным вариантам осуществления клеткой является клетка млекопитающих. В качестве другой опции, клеткой может быть транскомплементарная пакующая клеточная линия, которая обеспечивает функции, удаленные из дефектного по репликации вируса-помощника, например, 293 клетки или других E1a транскомплементарные клетки.

Репликация AAV и последовательности капсидов можно получить любым способом, известным в данной области. Современные протоколы обычно экспрессируют гены AAV гер/сар на одной плазмиде. Нет необходимости, чтобы последовательности

репликация и упаковки AAV были осуществлены вместе, хотя это может быть удобно для этого. Последовательности AAV гер и/или сар могут быть введены с помощью любого вирусного или невирусного вектора. Например, последовательности гер/сар могут быть введены гибридным вектором аденовируса или герпесвируса (например, вставлены в области E1a или E3 удаленного аденовирусного вектора). Векторы EBV также можно использовать для экспрессии генов AAV сар и гер. Одно преимущество этого способа состоит в том, что векторы EBV являются эписомальными, но сохраняют большое количество копий на протяжении всей последующих делений клеток (т.е. Стабильно интегрированы в клетку в виде внехромосомных элементов, обозначаемых как «ядерный эписом на основе EBV», см. Margolski (1992) *Curr. Top. Microbiol. Immun.* 158:67).

В качестве дополнительной альтернативы, последовательности гер/сар можно стабильно встраивать в клетку.

Обычно последовательности AAV гер/сар не будут фланкированы TR для предотвращения спасения и/или упаковки этих последовательностей.

Матрицу нуклеиновой кислоты можно вводить в клетку с использованием любого способа, известного в данной области. Например, матрицу можно вводить с помощью невирусного (например, плазмиды) или вирусного вектора. Согласно отдельным вариантам осуществления матрицу нуклеиновой кислоты вводят с помощью герпесвирусного или аденовирусного вектора (например, вставленного в E1a или E3 области удаленного аденовируса). В качестве еще одной иллюстрации Palombo с соавт. (1998) *J. Virology* 72:5025, описывает бакуловирусный вектор, несущий репортерный ген, фланкированный посредством AAV TR. Векторы EBV также можно использовать для доставки матрицы, как описано выше относительно генов гер/сар.

Согласно еще одному типичному варианту осуществления матрицу нуклеиновой кислоты вводят путем реплицирующегося gAAV вируса. Согласно другим вариантам осуществления AAV провирус, содержащий матрицу нуклеиновой кислоты, стабильно интегрируют в хромосому клетки.

Для улучшения титров вирусов клетке можно обеспечить функции вируса-помощника (например, аденовируса или герпесвируса), которые способствуют продуктивной AAV инфекции. В данной области известны последовательности вируса-помощника, необходимые для репликации AAV. Обычно эти последовательности будут предоставлять вектор аденовируса или герпесвируса-помощника. Альтернативно, последовательности аденовируса или герпесвируса может нести другой невирусный или вирусный вектор, например, в виде неинфекционной аденовирусной миниплазмиды, которая несет все вспомогательные гены, которые способствуют эффективному получению AAV, как описано у Ferrari с соавт. (1997) *Nature Med.* 3:1295, и в патентах США №№ 6040183 и 6093570.

Кроме того, функции вируса-помощника может предоставить пакующая клетка с вспомогательными последовательностями, встроенными в хромосому или сохраненными в качестве стабильного внехромосомного элемента. Обычно последовательности вируса-

помощника нельзя упаковать в AAV вирионы, например, их не фланкируют TR.

Специалистам в данной области будет понятно, что может быть предпочтительно обеспечивать AAV репликацию и последовательности капсидов и последовательности вируса–помощника (например, последовательности аденовируса) в одной вспомогательной конструкции. Этой вспомогательной конструкцией может быть невирусная или вирусная конструкция. В качестве одной неограничивающей иллюстрации, вспомогательной конструкцией может быть гибридный аденовирус или гибридный герпесвирус, содержащий гены AAV *rep/cap*.

В одном конкретный вариант осуществления, последовательности AAV *rep/cap* и последовательности аденовируса–помощника обеспечивают с помощью одного вектора аденовируса–помощника. Кроме того, этот вектор может дополнительно содержать матрицу нуклеиновой кислоты. Последовательности AAV *rep/cap* и/или гAAV матрицу можно вставить в удаленную область (например, E1a или E3 области) аденовируса.

Согласно дополнительному варианту осуществления последовательности AAV *rep/cap* и последовательности аденовируса–помощника обеспечивают с помощью одного вектора аденовируса–помощника. Согласно этому варианту осуществления гAAV матрицу можно предоставить в виде плазмидной матрицы.

Согласно еще одному иллюстративному варианту осуществления последовательности AAV *rep/cap* и последовательности аденовируса–помощника обеспечивают с помощью одного вектора аденовируса–помощника, а гAAV матрицу встраивают в клетку в виде провируса. Альтернативно, гAAV матрицу обеспечивают с помощью EBV вектора, который сохраняется внутри клетки в виде внехромосомного элемента (например, в виде EBV на основе ядерного эписома).

Согласно дополнительному иллюстративному варианту осуществления последовательности AAV *rep/cap* и последовательности аденовируса–помощника обеспечивают с помощью одного аденовируса–помощника. гAAV матрицу можно предоставить в виде отдельного реплицирующегося вирусного вектора. Например, гAAV матрицу можно предоставить с помощью гAAV частицы или второй рекомбинантной аденовирусной частицы.

Согласно вышеприведенным способам гибридный аденовирусный вектор обычно содержит 5' и 3' цис последовательности аденовируса, достаточные для репликации и упаковки аденовируса (т.е. концевых повторов и PAC последовательности аденовируса). Последовательности AAV *rep/cap* и, если присутствует, гAAV матрицу встраивают в скелет аденовируса и фланкируют 5' и 3' цис последовательностями, так что эти последовательности можно упаковывать в аденокапсиды вирусов. Как описано выше, последовательности аденовируса–помощника и последовательности AAV *rep/cap* обычно не фланкируют TR, так что эти последовательности не упаковывают в AAV вирионы.

Zhang с соавт. ((2001) *Gene Ther.* 18:704–12) описывает химерный помощник, содержащий как аденовирус, так и гены AAV *rep* и *cap*.

Герпесвирус также можно использовать в качестве вируса–помощника в способах



упаковки AAV. Гибридные герпесвирусы, кодирующие AAV Rep белок (белки), преимущественно могут облегчать масштабируемые схемы получения вектора AAV. описан вектор гибридного симплексного вируса герпес I типа (HSV-1), экспрессирующий гены гер и сар AAV-2 (Conway с соавт. (1999) *Gene Therapy* 6:986 и WO 00/17377).

В качестве дополнительной альтернативы, вирусные векторы согласно раскрытию можно получать в клетках насекомых с использованием бакуловирусных векторов для доставки генов гер/сар и гAAV матрицы, как описано, например, у Urabe с соавт. (2002) *Human Gene Therapy* 13:1935–43.

Банки AAV векторов, не содержащие контаминирующий вирус-помощник, можно получить с помощью любого способа, известного в данной области. Например, AAV и вирус-помощник можно легко дифференцировать на основе размера. AAV также можно отделить от вируса-помощника на основе аффинной хроматографии [например, для гепаринового субстрата (Zolotukhin с соавт. (1999) *Gene Therapy* 6:973) или с использованием аффинной смолы (Wang с соавт. (2015), *Mol Ther Methods Clin Dev* 2:15040) или, например, для других способы (рассмотренных у Qu с соавт. (2015) *Curr Pharm Biotechnol.* 16(8):684–95)]. Удаленные дефектные по репликации вирусы-помощник можно использовать так, чтобы любой контаминирующий вирус-помощник не был способен к репликации. В качестве дополнительной альтернативы, можно использовать аденовирус-помощник с отсутствующей экспрессией поздних генов, так как, чтобы опосредовать упаковку AAV вируса, аденовирусу требуется экспрессия только ранних генов. В данной области известны мутанты аденовируса, дефектные по экспрессии поздних генов (например, мутанты аденовируса ts100K и ts149).

#### Рекомбинантные Вирусные Векторы

Вирусные векторы согласно настоящему раскрытию могут быть использованы для доставки нуклеиновых кислот в клетки *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo*. В частности, вирусные векторы преимущественно можно использовать для доставки или переноса нуклеиновых кислот в клетки животных, в том числе млекопитающих.

Любую интересующую последовательность (последовательности) гетерологичной нуклеиновой кислоты можно доставить в вирусные векторы согласно настоящему раскрытию. Интересующие нуклеиновые кислоты включают нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептиды, включая терапевтические (например, для медицинского или ветеринарного применения) или иммуногенные (например, для вакцин) белки и/или функциональные или терапевтические молекулы РНК.

Терапевтические полипептиды включают, но без ограничения, трансмембранный регуляторный белок муковисцидоза (CFTR), дистрофин (включая мини-и микро-дистрофины, см. Например, Vincent с соавт. (1993) *Nature Genetics* 5:130; патентную публикацию США № 2003/017131; международную публикацию WO/2008/088895, Wang с соавт. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:13714–13719 (2000); и Gregorevic с соавт. *Mol. Ther.* 16:657–64 (2008)), пропептид миостатин, фоллистатин, активиновый растворимый рецептор II типа, IGF-1, противовоспалительные полипептиды, такие как доминантный

мутант Iкарпа В, саркоспан, атрофин (Tinsley с соавт. (1996) Nature 384:349), мини-атрофин, факторы коагуляции (например, Фактор VIII, Фактор IX, Фактор X и т.д.), эритропоэтин, ангиостатин, эндостатин, каталаза, тирозин гидроксилаза, супероксид дисмутаза, лептин, рецептор LDL, липопротеин липаза, орнитин транскарбамилаза,  $\beta$ -глобин,  $\alpha$ -глобин, спектирн,  $\alpha_1$ -антитрипсин, аденозин дезаминаза, гипоксантин гуанин фосфорибозилтрансфераза,  $\beta$ -глюкоцереброзидаза, сфингомиелиназа, лизосомальная гексозаминидаза А, дегидрогеназа кетокислот с разветвленной цепью, белок RP65, цитокины (например,  $\alpha$ -интерферон,  $\beta$ -интерферон, интерферон- $\gamma$ , интерлейкин-2, интерлейкин-4, гранулоцитарно-моноцитарный колониестимулирующий фактор, лимфотоксин и тому подобное), пептидные факторы роста, нейротрофические факторы и гормоны (например, соматотропин, инсулин, инсулиноподобные факторы роста 1 и 2, фактор роста тромбоцитов, эпидермальный фактор роста, фактор роста фибробластов, фактор роста нервов, нейротрофический фактор -3 и -4, нейротрофические фактор головного мозга, костные морфогенетические белки [содержащие RANKL и VEGF], глиальный фактор роста, трансформирующий фактор роста - $\alpha$  и - $\beta$  и тому подобное), лизосомная кислая  $\alpha$ -глюкозидаза,  $\alpha$ -галактозидаза А, рецепторы (например, растворимый рецептор фактора некроза опухоли  $\alpha$ ), S100A1, парвальбумин, аденилилциклаза 6 типа, молекула, которая модулирует обработку кальция (например, SERCA<sub>2A</sub>, Ингибитор 1 PP1 и их фрагментов [например, WO 2006/029319 и WO 2007/100465]), молекула, которая воздействует на нокдаун G-белка, соединенного с рецептором киназы 2 типа, такой как усеченные конститутивно активные bARKct, противовоспалительные факторы, такие как IRAP, антимиостатиновые белки, аспартоацилаза, моноклональные антитела (включая одноцепочечные моноклональные антитела; иллюстративным Mab является Herceptin<sup>®</sup> Mab), нейропептиды и их фрагменты (например, галанин, Нейропептид Y (см. U.S. 7,071,172), ингибиторы ангиогенеза, такие как вазохибины и другие ингибиторы VEGF (например, вазохибин 2 [см. WO JP2006/073052])). Другие иллюстративные гетерологичные нуклеотидные последовательности кодируют продукты суицидальных генов (например, тимдинкиназу, цитозиндезаминазу, токсин дифтерии и фактора некроз опухоли), белки, придающие устойчивость к лекарственным средствам, используемым при противораковой терапии, продукты гена-супрессора опухоли (например, p53, Rb, Wt-1), TRAIL, FAS-лиганд и любой другой полипептид, который оказывает терапевтическое действие на нуждающегося в этом пациента. Векторы AAV также можно использовать для доставки моноклональных антител и фрагментов антител, например, антител или фрагментов антител, направленных против миостатина (см. Например, Fang с соавт. Nature Biotechnology 23:584-590 (2005)).

Гетерологичная нуклеотидные последовательности, кодирующие полипептиды, включают последовательности, кодирующие репортерные полипептиды (например, фермент). Репортерные полипептиды в известны данной области и включают, но без ограничения, зеленый флуоресцентный белок (GFP),  $\beta$ -галактозидазу, щелочную

фосфатазу, люциферазу и ген хлорамфеникол–ацетилтрансферазы.

Необязательно, гетерологичная молекула нуклеиновой кислоты может кодировать секретируемый полипептид (например, полипептид, который представляет собой секретируемый полипептид в своем нативном состоянии или который был сконструирован с возможностью секреции, например, за счет функциональной связи с секреторной сигнальной последовательностью, как известно в данной области).

Альтернативно, в отдельных вариантах осуществления согласно настоящему раскрытию, гетерологичная нуклеиновая кислота может кодировать антисмысловую нуклеиновую кислоту, рибозим (например, как описано в патенте США № 5877022), РНК, которые осуществляют опосредуемый сплайсосомой транс–сплайсинг (см. Puttaraju с соавт. (1999) *Nature Biotech.* 17:246; патент США № 6013487; патент США № 6083702), интерферирующую РНК (RNAi), включая siRNA, shRNA или miRNA, которые опосредуют сайленсинг генов (см. Sharp с соавт. (2000) *Science* 287:2431), и другие нетранслируемые РНК, такие как «направляющие» РНК (Gorman с соавт. (1998) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 95:4929; патент США № 5869248 Yuan et al.) и тому подобное. Иллюстративные нетранслируемые РНК включают RNAi против продукта гена множественной лекарственной устойчивости (MDR) (например, для лечения и/или предотвращения опухолей и/или для введения в сердце для предотвращения вреда от химиотерапии), RNAi против миостатина (например, для мышечной дистрофии Дюшенна), RNAi против VEGF (например, для лечения и/или предотвращения опухолей), RNAi против фосфоламбана (например, для лечения сердечно–сосудистых заболеваний, см. Например, Andino с соавт. *J. Gen Med.* 10:132–142 (2008) и Li с соавт. *Acta Pharmacol Sin.* 26:51–55 (2005)); ингибирующие фосфоламбан или доминантно–негативные молекулы, такие как фосфоламбан S16E (например, для лечения сердечно–сосудистых заболеваний, см. Например, Hoshijima с соавт. *Nat. Med.* 8:864–871 (2002)), RNAi для аденозинкиназы (например, для эпилепсии) и RNAi, направленные против патогенных организмов и вирусов (например, вирус гепатита В и/или С, вирус иммунодефицита человека, CMV, симплексный вирус герпеса, вирус папилломы человека и т.д.).

Кроме того, можно доставить нуклеотидную последовательность, которая направляет альтернативный сплайсинг. Для иллюстрации, антисмысловую последовательность (или другую ингибирующую последовательность), комплементарную 5' и/или 3' сайту сплайсинга экзона 51 дистрофина, можно доставлять в сочетании с промотором малой ядерной (sn) РНК U1 или U7, чтобы вызвать пропуск этого экзона. Например, последовательность ДНК, содержащую промотор snRNA U1 или U7, расположенный 5' относительно антисмысловой/ингибирующей последовательности (последовательностей), можно упаковывать и доставлять в модифицированном капсиде согласно раскрытию.

Вирусный вектор также может содержать гетерологичную молекулу нуклеиновой кислоты, которая имеет общую гомологию и рекомбинирует с локусом на хромосоме хозяин. Этот подход можно использовать, например, для корректировки генетического

нарушения в клетке-хозяине.

Настоящее изобретение также относится к вирусным векторам, которые экспрессируют иммуногенный полипептид, например, для вакцинации. Молекула нуклеиновой кислоты может кодировать любой интересующий известный в данной области иммуноген, включая, но без ограничения, иммуногены из вируса иммунодефицита человека (HIV), вируса иммунодефицита обезьян (SIV), вируса гриппа, белков gag HIV или SIV, опухолевых антигенов, раковых антигенов, бактериальных антигенов, вирусных антигенов и тому подобное.

Иммуногенным полипептидом может быть любой полипептид, подходящий для вызова иммунного ответа и/или защиты пациента от инфекции и/или заболевания, включая, но без ограничения, микробные, бактериальные, протозойные, паразитарные, грибковые и/или вирусные инфекции и заболевания. Например, иммуногенным полипептидом может быть иммуноген ортомиксовируса (например, иммуноген вируса гриппа, такой как поверхностный белок геммагглютинина вируса агриппа (HA) или нуклеопротеин вируса гриппа или иммуноген конского вируса гриппа) или иммуноген лентивируса (например, иммуноген вируса инфекционной анемии лошадей, иммуноген вируса иммунодефицита обезьян (SIV) или иммуноген вируса иммунодефицита человека (HIV), такой как белок GP160 оболочки HIV или SIV, белки матрицы/капсида HIV или SIV и продукты генов gag, pol и env HIV или SIV). Иммуногенным полипептидом также может быть иммуноген аренавируса (например, иммуноген вируса лихорадки Ласса, такой как нуклеокапсидный белок вируса лихорадки Ласса и гликопротеин оболочки лихорадки Ласса), иммуноген поксвируса (например, иммуноген вируса коровьей оспы, такой как продукты генов L1 или L8 вируса коровьей оспы), иммуноген флавивируса (например, иммуноген вируса желтой лихорадки или иммуноген вируса японского энцефалита), иммуноген филоввируса (например, иммуноген вируса Эбола или иммуноген вируса Марбург, например, генные продукты NP и GP), иммуногена буньявируса (например, иммуногены вируса RVFV, CCHF и/или вируса SFS) или иммуноген коронавируса (например, иммуноген инфекционного коронавируса человека, например, гликопротеин оболочки человеческого коронавируса или иммуноген вируса трансмиссивного свиного гастроэнтерита или иммуноген вируса инфекционного бронхита птиц). Кроме того, иммуногенный полипептид может представлять собой иммуноген полиомиелита, иммуноген герпеса (например, иммуногены CMV, EBV, HSV), иммуноген паротита, иммуноген кори, иммуноген краснухи, токсин дифтерии или другой иммуноген дифтерии, антиген коклюша, иммуноген гепатита (например, гепатита А, гепатита В, гепатита С и т.д.) и/или любой другой вакцинный иммуноген, известный сейчас или идентифицированный в качестве иммуногена позже.

Альтернативно, иммуногенным полипептидом может быть любой антиген опухолевой или раковой клетки. Необязательно, опухолевый или раковый антиген экспрессируется на поверхности раковой клетки. Иллюстративные антигены раковых и опухолевых клеток описаны у S.A. Rosenberg (Immunity 10: 281 (1991)). Другие

Согласно дополнительным вариантам осуществления гетерологичная нуклеиновая кислота может кодировать (a) сайт–направленный модифицирующий полипептид на основе нуклеаз «цинковых пальцев» или мегануклеаз или эндонуклеаз или TALEN или нуклеаз на основе системы CRISPR/Cas, которые содержат связывающий РНК участок, который взаимодействует с нацеливающей на ДНК молекулой РНК (gRNA), или мРНК, кодирующей такой полипептид; (b) одну или более молекул направляющей РНК (gRNA), содержащих нуклеотидную последовательность, которая является комплементарной к последовательности в ДНК–мишени, и второй сегмент, который взаимодействует с сайт–направленным модифицирующим полипептидом; и/или (c) одну или более молекул донорной матрицы ДНК, содержащих последовательность одно или двухспиральной ДНК, предназначенную для гомологичной рекомбинации в сайт–мишень генома млекопитающих. Например, вирусные векторы можно вводить в стволовые клетки и/или Т–лимфоциты *ex vivo*, культивируемые клетки, ткани и/или целые организмы *in vivo* и продукт экспрессированного гена обеспечивает возможность редактирования, разрушения, активации транскрипции и/или репрессии генов–мишеней у хозяина.

Специалистам в данной области будет понятно, что интересующую

гетерологичную молекулу (молекулы) нуклеиновой кислоты можно функционально связать с подходящими регуляторными последовательностями. Например, гетерологичную молекулу нуклеиновой кислоты можно функционально связать с элементами регулирования экспрессии, такими как сигналы регулирования транскрипции/трансляции, точки начала репликации, сигналы полиаденилирования, участок внутренней посадки рибосомы (IRES), промоторы и/или энхансеры и тому подобное.

Кроме того, регулируемой экспрессии интересующей гетерологичной молекулы (молекул) нуклеиновой кислоты можно достичь на посттранскрипционном уровне, например, путем регулирования селективного сплайсинга различных интронов за счет присутствия или отсутствия олигонуклеотида, малой молекулы и/или другого соединения, которое выборочно блокирует сплайсинговую активность в определенных сайтах (например, как описано в WO 2006/119137).

Специалистам в данной области будет понятно, что можно использовать множество элементов промотора/энхансера в зависимости от уровня и требуемой тканеспецифической экспрессии. Промотор/энхансер может быть конститутивным или индуцируемым в зависимости от требуемой картины экспрессии. Промотор/энхансер может быть нативным или чужеродным и представлять собой природную или синтетическую последовательность. Под чужеродным подразумевается, что область инициации транскрипции не обнаружена у хозяина дикого типа, которому введена область инициации транскрипции.

Согласно отдельным вариантам осуществления элементы промотора/энхансера могут быть нативными для клетки-мишени или подлежащего лечению пациента. Согласно типовым вариантам осуществления элемент промотора/энхансера может быть нативным для гетерологичной последовательности нуклеиновой кислоты. элемент промотора/энхансера обычно выбирают таким образом, чтобы он функционировал в интересующей клетке (клетках)-мишенях. Кроме того, в отдельных вариантах осуществления элементом промотором/энхансером может быть элемент промотора/энхансера млекопитающего. Элемент промотора/энхансера может быть конститутивным или индуцируемым.

Индукцируемые элементы контроля экспрессии, как правило, выгодны в тех вариантах применения, когда требуется обеспечить регуляцию сверхэкспрессии гетерологичной последовательности нуклеиновой кислоты. Индуцируемые элементы промоторы/энхансер для доставки генов могут быть тканеспецифичными или предпочтительными элементами промоторами/энхансерами и содержать мышечные специфические или предпочтительные (включая сердечные, скелетные и/или гладкомышечные специфичные или предпочтительные), специфические или предпочтительные для нервной ткани (включая специфические или предпочтительные для головного мозга), специфичные или предпочтительные для глаз (включая специфичные для сетчатки и роговицы), специфические или предпочтительные для печени, специфические или предпочтительные для костного мозга, специфические или

предпочтительные для поджелудочной железы, специфические или предпочтительные для селезенки и специфические или предпочтительные для легких элементы промотор/энхансер. Другие индуцируемые элементы промотор/энхансер включают, индуцируемые гормонами и индуцируемые металлами элементы. Иллюстративные индуцируемые элементы промоторы/энхансеры включают, но без ограничения, включающий/выключающий элемент Tet, индуцируемый RU486 промотор, индуцируемый экдизоном промотор, индуцируемый рапамицином промотор и металлотронеиновый промотор.

Согласно вариантам осуществления, в которых гетерологичная последовательность (последовательности) нуклеиновой кислоты транскрибируется и затем транслируется в клетках-мишенях, специфические сигналы инициации обычно включаются для эффективной трансляции вставленных кодирующих последовательностей белка. Эти экзогенные трансляционные регуляторные последовательности, которые могут включать иницирующий кодон ATG и смежные последовательности, могут иметь различное происхождение, как природное, так и синтетическое.

Вирусные векторы согласно настоящему раскрытию предоставляют средства для доставки гетерологичных нуклеиновых кислот в широкий спектр клеток, включая делящиеся и не делящиеся клетки. Вирусные векторы можно использовать для доставки интересующей нуклеиновой кислоты в клетку *in vitro*, например, для получения полипептида *in vitro* или для генной терапии *ex vivo*. Вирусные векторы кроме того полезны в способе доставки нуклеиновой кислоты пациенту, например, для экспрессии иммуногенного или терапевтического полипептида или функциональной РНК. Таким образом, полипептид или функциональную РНК можно получать *in vivo* у пациента. Пациент может нуждаться в полипептиде, потому что у пациента имеется дефицит полипептида. Кроме того, способ может быть осуществлен на практике, поскольку получение полипептида или функциональной РНК у пациента может оказывать некоторое благоприятное воздействие.

Вирусные векторы также можно использовать для получения представляющего интерес полипептида или функциональной РНК в культивируемых клетках или у пациента (например, используя пациента в качестве биореактора для получения полипептида или для наблюдения за действием функциональной РНК на пациента, например, в сочетании с методами скрининга).

Как правило, вирусные векторы согласно настоящему изобретению можно использовать для доставки гетерологичной нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид или функциональную РНК, для лечения и/или предотвращения любого болезненного состояния, для которого полезно доставлять терапевтический полипептид или функциональную РНК. Иллюстративные болезненные состояния включают, но без ограничения: муковисцидоз (трансмембранный регуляторный белок муковисцидоза) и другие заболевания легких, гемофилию А (фактор VIII), гемофилию В (фактор IX), талассемию ( $\beta$ -глобин), анемию (эритропоэтин) и другие заболевания крови, болезнь

Альцгеймера (GDF; неприлизин), рассеянный склероз ( $\beta$ -интерферон), болезнь Паркинсона (нейротрофический фактор, полученный из глиальной клеточной линии [GDNF]), болезнь Хантингтона (RNAi для удаления повторов), боковой амиотрофический склероз, эпилепсию (галанин, нейротрофические факторы) и другие неврологические нарушения, рак (эндостатин, ангиостатин, TRAIL, FAS-лиганд, цитокины, включая интерфероны; RNAi, включая RNAi против VEGF или продукта гена множественной лекарственной устойчивости, miR-26a [например, для гепатоцеллюлярной карциномы]), сахарный диабет (инсулин), мышечные дистрофии, включая Дюшенн (дистрофин, мини-дистрофин, инсулиноподобный фактор роста I, саркогликан [например,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ], RNAi против миостатина, миостатин пропептид, фоллистатин, растворимый рецептор активина II типа, противовоспалительные полипептиды, такие как доминантный мутант Ikarpa B, саркоспан, утрофин, мини-утрофин, антисмысловые или RNAi против границ сплайсинга в гене дистрофина, вызывающие пропуск экзонов [см., например, WO/2003/095647], антисмысловые snRNA против U7, вызывающие пропуск экзонов [см., например, WO/2006/021724], и антитела или фрагменты антител против миостатина или миостатина пропептида) и болезнь Беккера, Гоше (глюкоцереброзидаза), болезнь Херлера ( $\alpha$ -L-идуронидаза), дефицит аденозин-деаминазы (аденозин-деаминаза), болезнь накопления гликогена (например, болезнь Фабри [ $\alpha$ -галактозидаза] и болезнь Помпе [лизосомная кислая  $\alpha$ -глюкозидаза]) и другие нарушения обмена веществ, врожденная эмфизема ( $\alpha$ 1-антитрипсин), синдром Леша-Нихана (гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансфераза), болезнь Ниманна-Пика (сфингомиелиназа), болезнь Тея Сакса (лизосомальная гексозаминидаза A), болезнь мочи с запахом кленового сиропа (кетокислая дегидрогеназа с разветвленной цепью), дегенеративные заболевания сетчатки (и другие заболевания глаз и сетчатки); например, PDGF для дегенерации желтого пятна и/или вазохибин или другие ингибиторы VEGF или другие ингибиторы ангиогенеза для лечения/профилактики заболеваний сетчатки, например, при диабете I типа), заболевания твердых органов, таких как головной мозг (включая болезнь Паркинсона [GDNF], астроцитомы [эндостатин, ангиостатин и/или RNAi против VEGF], глиобластомы [эндостатин, ангиостатин и/или RNAi против VEGF]), печень, почки, сердце, включая застойную сердечную недостаточность или заболевание периферических артерий (PAD) (например, путем доставки ингибитора белковой фосфатазы I (I-1) и его фрагментов (например, IIC), serca2a, белки «цинковые пальцы», которые регулируют ген фосфоламбана, Barkct,  $\beta$ 2-адренергический рецептор,  $\beta$ 2-адренергический рецептор киназа (BARK), фосфоинозитид-3 киназа (PI3 киназа) S100A1, парвальбумин, аденилатциклаза 6 типа, молекула, которая воздействует на нокдаун, связанный с G-протеиновой рецепторной киназой 2 типа, такой как усеченный конститутивно активный bARKct; кальсарцин, RNAi против фосфоламбана; ингибирующие фосфоламбан или доминантно-негативные молекулы, такие как фосфоламбан S16E и т.д.), артрит (инсулиноподобные факторы роста), заболевания суставов (инсулиноподобный фактор роста 1 и/или 2), гиперплазию интимы (например, путем доставки эно, ино), улучшение выживаемости при пересадках



сердца (супероксиддисмутаза), СПИД (растворимый CD4), атрофию мышц (инсулиноподобный фактор роста I), почечную недостаточность (эритропоэтин), анемию (эритропоэтин), артрит (противовоспалительные факторы, такие как IRAP и растворимый рецептор TNF $\alpha$ ), гепатит ( $\alpha$ -интерферон), дефицит рецепторов ЛПНП (рецептор ЛПНП), гипераммониемию (орнитин транскарбамилаза), болезнь Краббе (галактоцереброзидаза), атрофию мышц позвоночника (SMA), болезнь Баттена, спинномозговую атаксию головного мозга, включая атаксию Фридрейха, SCA1, SCA2 и SCA3, фенилкетонурию (фенилаланин гидроксилаза), аутоиммунные заболевания и тому подобное. Данное раскрытие кроме того можно использовать после трансплантации органов для увеличения успеха трансплантации и/или для уменьшения негативных побочных эффектов трансплантации органов или дополнительных методов лечения (например, путем введения иммунодепрессантов или ингибирующих нуклеиновых кислот для блокирования выработки цитокинов). В качестве другого примера, костные морфогенные белки (включая BMP 2, 7 и т.д., RANKL и/или VEGF) можно вводить с аллотрансплантатом кости, например, после перелома или хирургического удаления у больного раком.

Настоящее раскрытие также можно использовать для получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPS). Например, вирусный вектор согласно раскрытию можно использовать для доставки нуклеиновой кислоты (кислот), ассоциированной со стволовыми клетками, в не плюрипотентную клетку, такую как взрослые фибробласты, клетки кожи, клетки печени, клетки почек, жировые клетки, клетки сердца, нервные клетки, эпителиальные клетки, эндотелиальные клетки и тому подобное. В данной области известны нуклеиновые кислоты, кодирующие факторы, связанные со стволовыми клетками. Неограничивающие примеры таких факторов, связанных со стволовыми клетками и плюрипотентностью, включают Oct-3/4, семейство SOX (например, SOX1, SOX2, SOX3 и/или SOX15), семейство Klf (например, Klf1, Klf2, Klf4 и/или Klf5), семейство Myc (например, C-myc, L-myc и/или N-myc), NANOG и/или LIN28.

Настоящее раскрытие также можно использовать для лечения и/или профилактики эпилепсии, инсульта, черепно-мозговой травмы, когнитивных расстройств, поведенческих расстройств, психических расстройств, болезни Хантингтона, болезни Альцгеймера, бокового амиотрофического склероза (БАС), а также любого другого нейродегенеративного состояния, при котором можно извлечь выгоду или может потребоваться аксональная/нейрональная регенерация или восстановление.

Согласно отдельным вариантам осуществления настоящее раскрытие может быть осуществлено на практике для содействия регенерации аксонов и восстановлению нейронов, восстановлению цепей и/или пополнению утраченных нейронов в качестве корректирующей терапии, например, посредством направленной регуляции или сверхэкспрессии факторов дифференцировки и репрограммирования стволовых клеток, таких как FoxJ1, Fox2 NeuroD2, NG2 или Olig2 и/или microRNA, таких как miR-137, MiR124, а также любых других факторов или miRNA, вовлеченных в развитие и

дифференцировку нейронов.

Перенос генов имеет существенное потенциальное применение для понимания и обеспечения терапии болезненных состояний. Существует ряд наследственных заболеваний, при которых известны и были клонированы дефектные гены. Обычно вышеупомянутые болезненные состояния делят на два класса: состояния дефицита, обычно ферментов, которые обычно наследуются рецессивным образом, и несбалансированные состояния, которые могут включать регуляторные или структурные белки и которые обычно наследуются доминирующим образом. Для заболеваний с состоянием дефицита перенос гена можно использовать для введения нормального гена в пораженные ткани для заместительной терапии, а также для создания животных моделей заболевания с использованием антисмысловых мутаций. Для неуравновешенных болезненных состояний перенос гена можно использовать для создания болезненного состояния в модельной системе, которое затем можно использовать в усилиях по противодействию болезненному состоянию. Таким образом, вирусные векторы согласно настоящему раскрытию позволяют проводить лечение и/или предотвращать генетические заболевания.

Вирусные векторы согласно настоящему раскрытию также можно использовать для обеспечения функциональной РНК в клетку *in vitro* или *in vivo*. Например, экспрессия функциональной РНК в клетке может снизить экспрессию клеткой определенного белка-мишени. Соответственно, функциональную РНК можно вводить для снижения экспрессии конкретного белка у нуждающегося в этом пациента. Функциональную РНК также можно вводить в клетки *in vitro* для регуляции экспрессии генов и/или физиологии клеток, например, для оптимизации систем культивирования клеток или тканей или в методах скрининга.

Кроме того, вирусные векторы согласно настоящему раскрытию находят применение в способах диагностики и скрининга, в результате чего представляющую интерес нуклеиновую кислоту временно или стабильно экспрессируют в системе культивирования клеток или, альтернативно, в трансгенной животной модели.

Вирусные векторы согласно настоящему изобретению также можно использовать для различных нетерапевтических целей, включая, но без ограничения, использование в протоколах для оценки воздействия на гены, клиренса, транскрипции, трансляции и т.д., как будет очевидно для специалиста в данной области. Вирусные векторы также можно использовать для оценки безопасности (распространения, токсичности, иммуногенности и т.д.). Такие данные, например, рассматриваются Управлением по надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США как часть процесса одобрения регулирующих органов до оценки клинической эффективности.

В качестве дополнительного аспекта вирусные векторы согласно настоящему изобретению можно использовать для создания иммунного ответа у пациента. Согласно этому варианту осуществления вирусный вектор, содержащий гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую иммуногенный полипептид,

можно вводить пациенту, и пациент получает активный иммунный ответ против иммуногенного полипептида. Иммуногенные полипептиды описаны выше. Согласно некоторым вариантам осуществления возникает защитный иммунный ответ.

Альтернативно, вирусный вектор можно вводить в клетку *ex vivo*, а измененную клетку вводят пациенту. Вирусный вектор, содержащий гетерологичную нуклеиновую кислоту, вводят в клетку, и клетку вводят пациенту, где гетерологичная нуклеиновая кислота, кодирующая иммуноген, может экспрессироваться и индуцировать иммунный ответ у пациента против иммуногена. Согласно отдельным вариантам осуществления клетка представляет собой антиген–презентирующую клетку (например, дендритную клетку).

«Активный иммунный ответ» или «активный иммунитет» характеризуется «участием тканей и клеток хозяина после контакта с иммуногеном. Он включает дифференцировку и пролиферацию иммунокомпетентных клеток в лимфо–ретикулярных тканях, которые приводят к синтезу антител или развитию клеточной реактивности, или к тому и другому». Herbert B. Herscovitz, *Immunophysiology: Cell Function and Cellular Interactions in Antibody Formation*, in *IMMUNOLOGY: BASIC PROCESSES* 117 (Joseph A. Bellanti ed., 1985). В качестве альтернативы указано, что активный иммунный ответ устанавливается хозяином после воздействия на иммуноген инфекции или вакцинации. Активный иммунитет можно противопоставить пассивному иммунитету, который приобретается путем «передачи предварительно образованных веществ (антитело, фактор переноса, трансплантат тимуса, интерлейкин–2) от активно иммунизированного хозяина к неиммунному хозяину». Id.

В рамках настоящего изобретения «защитный» иммунный ответ или «защитный» иммунитет указывает на то, что иммунный ответ приносит некоторую пользу пациенту в том смысле, что он предотвращает или уменьшает частоту заболеваний. Альтернативно, защитный иммунный ответ или защитный иммунитет могут быть полезны при лечении и/или профилактике заболевания, в частности рака или опухолей (например, путем предотвращения рака или образования опухоли, путем вызова регрессии рака или опухоли и/или путем предотвращения метастазирования и/или предотвращения роста метастатических узелков). Защитные эффекты могут быть полными или частичными, если польза от лечения перевешивает любые его недостатки.

Согласно отдельным вариантам осуществления вирусный вектор или клетку, содержащую гетерологичную нуклеиновую кислоту, можно вводить в иммуногенно, эффективном количестве, как описано ниже.

Вирусные векторы согласно настоящему изобретению также можно вводить для иммунотерапии рака путем введения вирусного вектора, экспрессирующего один или несколько антигенов раковых клеток (или иммунологически сходной молекулы), или любого другого иммуногена, который вызывает иммунный ответ против раковой клетки. Чтобы проиллюстрировать, иммунный ответ можно выработать против антигена раковой клетки у пациента путем введения вирусного вектора, содержащего гетерологичную

нуклеиновую кислоту, кодирующую антиген раковой клетки, например, для лечения пациента с раком и/или для предотвращения развития у пациента рака. Вирусный вектор можно вводить пациенту *in vivo* или с использованием методов *ex vivo*, как описано в настоящем изобретении. Альтернативно, раковый антиген может экспрессироваться как часть капсида вируса или может быть иным образом связан с капсидом вируса (например, как описано выше).

В качестве еще одного альтернативного варианта для лечения и/или профилактики рака можно вводить любую другую терапевтическую нуклеиновую кислоту (например, RNAi) или полипептид (например, цитокин), известные в данной области.

В рамках настоящего изобретения термин «рак» охватывает образующие опухоль виды рака. Также, термин «раковая ткань» охватывает опухоли. «Антиген раковых клеток» охватывает антигены опухоли.

Термин «рак» имеет понятное в данной области значение, например, неконтролируемый рост ткани, которая потенциально может распространяться в отдаленные участки тела (то есть метастазировать). Иллюстративные виды рака включают, но без ограничения, меланому, аденокарциному, тимому, лимфому (например, неходжкинскую лимфому, лимфому Ходжкина), саркому, рак легкого, рак печени, рак толстой кишки, лейкоз, рак матки, рак молочной железы, рак простаты, рак яичников, рак шейки матки, рак мочевого пузыря, рак почки, рак поджелудочной железы, рак головного мозга и любой другой рак или злокачественное заболевание, известное в настоящее время или идентифицированное позже. В типовых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения и/или предотвращения образующих опухоль форм рака.

Термин «опухоль» также понимают в данной области, например, как аномальную массу недифференцированных клеток в многоклеточном организме. Опухоли могут быть злокачественными или доброкачественными. В типовых вариантах осуществления раскрытые в настоящем изобретении способы используют для предотвращения и лечения злокачественных опухолей.

Под терминами «лечить рак», «лечение рака» и эквивалентными терминами подразумевается, что степень тяжести рака снижается или, по меньшей мере, частично устраняется, и/или прогрессирование заболевания замедляется и/или контролируется, и/или болезнь стабилизируется. В конкретных вариантах осуществления эти термины указывают, что метастазирование рака предотвращается или уменьшается или, по меньшей мере, частично устраняется, и/или что рост метастатических узелков предотвращается или уменьшается или, по меньшей мере, частично устраняется.

Под терминами «предотвращение рака» или «предотвратить рак» и эквивалентными терминами подразумевается, что способы, по меньшей мере, частично устраняют или уменьшают и/или задерживают частоту и/или тяжесть возникновения рака. В качестве альтернативы утверждается, что можно уменьшить и/или отсрочить вероятность или возможность возникновения рака у пациента.

Согласно отдельным вариантам осуществления у пациента, страдающего раком можно извлечь клетки, и можно ввести их в контакт с вирусным вектором, экспрессирующим антиген раковой клетки, согласно настоящему изобретению. Затем модифицированную клетку вводят пациенту, посредством чего вызывают иммунный ответ против антигена раковой клетки. Этот способ предпочтительно можно использовать у пациентов с ослабленным иммунитетом, которые не могут вызвать достаточный иммунный ответ *in vivo* (то есть не могут продуцировать усиливающие антитела в достаточных количествах).

В данной области известно, что иммунные ответы можно усиливать с помощью иммуномодулирующих цитокинов (таких как,  $\alpha$ -интерферон,  $\beta$ -интерферон,  $\gamma$ -интерферон,  $\omega$ -интерферон,  $\tau$ -интерферон, интерлейкин-1 $\alpha$ , интерлейкин-1 $\beta$ , интерлейкин-2, интерлейкин-3, интерлейкин-4, интерлейкин 5, интерлейкин-6, интерлейкин-7, интерлейкин-8, интерлейкин-9, интерлейкин-10, интерлейкин-11, интерлейкин-12, интерлейкин-13, интерлейкин-14, интерлейкин-18, фактор роста В-клеток, лиганд CD40, фактор некроза опухоли- $\alpha$ , фактор некроза опухоли- $\beta$ , белок-1 хемоаттрактанта моноцитов, гранулоцитарно-моноцитарный колониестимулирующий фактор и лимфотоксин). Соответственно, иммуномодулирующие цитокины (предпочтительно, индуцирующие CTL цитокины) можно вводить пациенту в сочетании с вирусным вектором.

Цитокины можно вводить любым способом, известным в данной области. Пациенту можно вводить экзогенные цитокины, или альтернативно, пациенту можно доставлять нуклеиновую кислоту, кодирующую цитокин с использованием подходящего вектора, и цитокин получают *in vivo*.

#### Пациенты, Фармацевтические Готовые формы и Режимы введения

Вирусные векторы и капсиды согласно настоящему раскрытию находят применение как в ветеринарии, так и в медицине. Подходящие пациенты включают как птиц, так и млекопитающих. Термин «птичий» в рамках настоящего изобретения включает, но без ограничения, кур, уток, гусей, перепелов, индеек, фазанов, папугаев, длиннохвостых попугаев и тому подобное. Термин «млекопитающее» в рамках настоящего изобретения включает, но без ограничения, людей, приматов, не являющихся людьми, крупный рогатый скот, овец, козлов, лошадей, кошек, собак, зайцев и т.д. Пациенты-люди включают новорожденных, младенцев, подростков, взрослых и пациентов-стариков.

Согласно типовым вариантам осуществления пациент «нуждается» в способах согласно раскрытию.

Согласно отдельным вариантам осуществления изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей вирусный вектор и/или капсид согласно изобретению в фармацевтически приемлемом носителе и, необязательно, другие лекарственные средства, фармацевтические агенты, стабилизирующие агенты, буферы, носители, адъюванты, разбавители и т.д. Для инъекции носитель обычно представляет

собой жидкость. Для других способов введения носитель может быть твердым или жидким. Для ингаляционного введения носитель будет пригодным для вдыхания и необязательно может быть в форме твердых или жидких частиц.

Под «фармацевтически приемлемым» подразумевается материал, который не является токсичным или иным образом нежелательным, то есть материал можно вводить пациенту без каких-либо нежелательных биологических эффектов.

Одним аспектом настоящего изобретения является способ переноса нуклеиновой кислоты в клетку *in vitro*. Вирусный вектор можно вводить в клетки при соответствующей множественности заражения в соответствии со стандартными методами трансдукции, подходящими для конкретных клеток-мишеней. Титры вирусного вектора для введения можно варьировать в зависимости от типа и количества клеток-мишеней и конкретного вирусного вектора и могут быть определены специалистами в данной области без лишних экспериментов. В типовых вариантах осуществления в клетку вводят по меньшей мере около  $10^3$  инфекционных единиц, необязательно по меньшей мере около  $10^5$  инфекционных единиц.

Клетка (клетки), в которую вводят вирусный вектор, может быть любого типа, включая, но без ограничения, нервные клетки (включая клетки периферической и центральной нервной системы, в частности клетки головного мозга, такие как нейроны и олигодендроциты), клетки легких, клетки глаза (включая клетки сетчатки, пигментный эпителий сетчатки и клетки роговицы), эпителиальные клетки (например, клетки кишечного и респираторного эпителия), мышечные клетки (например, клетки скелетных мышц, клетки сердечной мышцы, клетки гладких мышц и/или клетки мышц диафрагмы), дендритные клетки, клетки поджелудочной железы (включая островковые клетки), клетки печени, клетки миокарда, костные клетки (например, стволовые клетки костного мозга), гемопоэтические стволовые клетки, клетки селезенки, кератиноциты, фибробласты, эндотелиальные клетки, клетки предстательной железы, половые клетки и тому подобное. В типовых вариантах осуществления клеткой может быть любая клетка-предшественник. В качестве дополнительной возможности клеткой может быть стволовая клетка (например, нервная стволовая клетка, стволовая клетка печени). В качестве еще одного альтернативного варианта клеткой может быть раковая или опухолевая клетка. Более того, клетка может иметь происхождение из любого вида, как указано выше.

Вирусный вектор можно вводить в клетки *in vitro* с целью введения модифицированных клеток пациенту. Согласно отдельным вариантам осуществления клетки берут у пациента, вводят в них вирусный вектор, а затем клетки вводят назад пациенту. В данной области известны способы взятия клеток у пациента для манипуляций *ex vivo*, с последующим введением назад пациенту (см. Например, патент США № 5399346). Альтернативно, рекомбинантный вирусный вектор можно вводить в клетки пациента-донора, в культивируемые клетки или в клетки из любого другого подходящего источника, и клетки вводят пациенту (т.е. Пациенту-«реципиенту»).

Подходящие клетки для доставки нуклеиновой кислоты *ex vivo* описаны выше.

Дозировки клеток для введения пациенту будут варьировать в зависимости от возраста, состояния и вида пациента, типа клетки, нуклеиновой кислоты, экспрессируемой клеткой, способа введения и тому подобное. Обычно, на дозу в фармацевтически приемлемом носителе следует вводить по меньшей мере от приблизительно  $10^2$  до приблизительно  $10^8$  клеток или по меньшей мере от приблизительно  $10^3$  до приблизительно  $10^6$  клеток. Согласно отдельным вариантам осуществления клетки трансдуцированные вирусным вектором, вводят пациенту в эффективном для лечения или для профилактики количестве в комбинации с фармацевтическим носителем.

Согласно некоторым вариантам осуществления вирусный вектор вводят в клетку, и клетку можно вводить пациенту для вызывания иммуногенного ответа против доставленного полипептида (например, экспрессируемого в виде трангена или в капсиде). Как правило, вводят количество клеток, экспрессирующих иммуногенно эффективное количество полипептида в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем. «Иммуногенно эффективное количество» представляет собой количество экспрессированного полипептида, которое является достаточным для того, чтобы вызвать активный иммунный ответ против полипептида у пациента, которому вводят фармацевтическую композицию. В отдельных вариантах осуществления дозировка является достаточной для обеспечения защитного иммунного ответа (как определено выше). Предоставленная степень защиты не обязательно должна быть полной или постоянной, если польза от введения иммуногенного полипептида перевешивает любые его недостатки.

Дополнительным аспектом согласно раскрытию является способ введения пациентам вирусного вектора и/или капсида вируса. Введение вирусных векторов и/или капсидов согласно настоящему раскрытию пациенту–человеку или животному можно осуществлять любыми способами, известными в данной области. Необязательно, вирусный вектор и/или капсид доставляют в эффективной для лечения или эффективной для предотвращения дозе в фармацевтически приемлемом носителе.

Вирусные векторы и/или капсиды согласно раскрытию кроме того можно вводить для вызова иммуногенного ответа (например, в виде вакцины). Обычно, иммуногенные композиции согласно настоящему раскрытию содержат иммуногенно эффективное количество вирусного вектора и/или капсида в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем. Необязательно, дозировка достаточна для создания защитного иммунного ответа (как определено выше). Предоставляемая степень защиты не обязательно должна быть полной или постоянной, если польза от введения иммуногенного полипептида перевешивает любые его недостатки. Пациенты и иммуногены описаны выше.

Дозировки вирусного вектора и/или капсида, подлежащие введению пациенту, зависят от способа введения, заболевания или состояния, которое нужно лечить и/или предотвращать, индивидуального состояния пациента, конкретного вирусного вектора или капсида и нуклеиновой кислоты, подлежащей доставке и т.п., и их можно определять

обычным способом. Иллюстративными дозами для достижения терапевтических эффектов являются титры, по меньшей мере, приблизительно  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$ ,  $10^{10}$ ,  $10^{11}$ ,  $10^{12}$ ,  $10^{13}$ ,  $10^{14}$ ,  $10^{15}$  трансдуцирующих единиц, необязательно приблизительно  $10^8$ – $10^{13}$  трансдуцирующих единиц.

Согласно отдельным вариантам осуществления можно использовать более одного введения (например, два, три, четыре или более введений) для достижения требуемого уровня экспрессии гена в течение периода с разными интервалами, например, ежедневно, еженедельно, ежемесячно, ежегодно и т.д.

Иллюстративные способы введения включают пероральный, ректальный, трансмукозальный, интраназальный, ингаляционный (например, через аэрозоль), буккальный (например, сублингвальный), вагинальный, внутриболоочечный, внутриглазной, трансдермальный, внутриутробный (или в яйцо), парентеральный (например, внутривенный), подкожный, внутрикожный, внутримышечный, внутрикожный, внутривенный, интрацеребральный и внутрисуставной), местный (например, на поверхности кожи и слизистой оболочки, включая поверхности дыхательных путей и трансдермальное введение), внутрилимфатический и тому подобное, а также прямую инъекцию в ткани или органы (например, в печень, скелетную мышцу, сердечную мышцу, диафрагму или головной мозг). Согласно некоторым вариантам осуществления внутримышечное введение включает введение в мышцы скелета, диафрагму и/или сердце. Также можно вводить в опухоль (например, в опухоль или около нее или в лимфатический узел). Наиболее подходящий путь в любом конкретном случае будет зависеть от характера и тяжести состояния, которое лечат и/или предотвращают, и от природы конкретного используемого вектора.

Доставку в ткани–мишени также можно обеспечить путем доставки депо, содержащего вирусный вектор и/или капсид. Согласно типовым вариантам осуществления депо, содержащее вирусный вектор и/или капсид, имплантируют в мышечную ткань скелета, сердца и/или диафрагмы, или эту ткань можно ввести в контакт с пленкой или другой матрицей, содержащей вирусный вектор и/или капсид. Такие имплантируемые матрицы или подложки описаны в патенте США № 7201898.

Согласно отдельным вариантам осуществления вирусный вектор и/или вирусный капсид согласно настоящему раскрытию вводят в мышцы скелета, мышцы диафрагмы и/или сердечную мышцу (например, для лечения и/или предотвращения мышечной дистрофии, болезни сердца). Согласно некоторым вариантам вирусный вектор и/или вирусный капсид согласно настоящему изобретению вводят для лечения PAD или застойной сердечной недостаточности.

Способы согласно раскрытию также можно применить для получения антисмысловой РНК, RNAi или другой функциональной РНК (например, рибозима) для системной доставки.

Инъектируемые препараты можно получать в обычных формах, либо в виде жидких растворов или суспензий, твердых форм, подходящих для раствора или суспензии в



жидкости перед инъекцией, либо в виде эмульсий. Альтернативно, вирусный вектор и/или капсиды вирусов согласно раскрытию можно вводить локальным, а не системным способом, например, в виде депо или готовой формы с замедленным высвобождением. Кроме того, вирусный вектор и/или капсид вируса можно доставлять прикрепленными к хирургически имплантируемой матрице (например, как описано в публикации патента США № US–2004–0013645–A1).

Вирусные векторы и капсиды вирусов можно вводить в ткани ЦНС (например, головной мозг, глаз), и это может преимущественно приводить к более широкому распространению вирусного вектора или капсида, чем это наблюдалось бы в отсутствие настоящего раскрытия.

В конкретных вариантах осуществления векторы доставки согласно раскрытию можно вводить для лечения заболеваний ЦНС, включая генетические нарушения, нейродегенеративные нарушения, психические расстройства и опухоли.

Иллюстративные заболевания ЦНС включают, но без ограничения, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, болезнь Хантингтона, болезнь Канавана, болезнь Ли, болезнь Рефсума, синдром Туретта, первичный латеральный склероз, амиотрофический латеральный склероз (БАС), прогрессирующую мышечную атрофию, болезнь Пика, мышечную дистрофию, рассеянный склероз, тяжелую миастению, болезнь Бинсвангера, нарушение вследствие травмы спинного мозга и/или головы (например, черепно-мозговой травмы), болезнь Тея Сакса, болезнь Леша-Ньяна, эпилепсию, инсульт, церебральный инфаркт, психические расстройства, включая расстройства настроения (например, депрессию, биполярное аффективное расстройство, стойкое аффективное расстройство, вторичное расстройство настроения), шизофрению, лекарственную зависимость (например, алкоголизм и другие зависимости от веществ), неврозы (например, тревогу, обсессивное расстройство, соматоформное расстройство, диссоциативное расстройство, горе, послеродовую депрессию), психоз (например, галлюцинации и бред), деменцию, паранойю, синдром дефицита внимания психосексуальные расстройства, любые нейродегенеративные состояния, при которых требуется или можно получить пользу от регенерации и/или восстановления аксонов/нейронов, когнитивные расстройства, поведенческие расстройства, расстройства сна, болевые расстройства, расстройства пищевого поведения или веса (например, ожирение, кахексия, нервная анорексия и булимия) и раковые заболевания и опухоли (например, опухоли гипофиза) ЦНС.

Нарушения ЦНС включают офтальмологические нарушения, вовлекающие сетчатку, задний тракт и зрительный нерв (например, пигментный ретинит, диабетическая ретинопатия и другие дегенеративные заболевания сетчатки, увеит, возрастная дегенерация желтого пятна, глаукома).

Большинство, если не все, офтальмологические заболевания и расстройства связаны с одним или несколькими из трех типов показаний: (1) ангиогенез, (2) воспаление и (3) дегенерация. Векторы доставки согласно настоящему изобретению можно

использовать для доставки антиангиогенных факторов; противовоспалительных факторов; факторов, которые замедляют дегенерацию клеток, способствуют сохранению клеток или способствуют росту клеток и комбинаций вышеперечисленного.

Например, диабетическая ретинопатия характеризуется ангиогенезом. Диабетическую ретинопатию можно лечить путем доставки одного или нескольких антиангиогенных факторов либо внутриглазно (например, в стекловидное тело), либо периокулярно (например, в субтенозову область). Один или несколько нейротрофических факторов также можно доставлять совместно, либо внутриглазно (например, интравитреально), либо периокулярно.

Увеит включает воспаление. Один или несколько противовоспалительных факторов можно вводить посредством внутриглазного введения (например, в стекловидное тело или переднюю камеру) вектора доставки согласно настоящему изобретению.

Пигментный ретинит, при сравнении, характеризуется дегенерацией сетчатки. Согласно типовым вариантам осуществления пигментный ретинит можно лечить путем внутриглазного (например, витреального) введения вектора доставки, кодирующего один или несколько нейротрофических факторов.

Возрастная макулярная дегенерация включает как ангиогенез, так и дегенерацию сетчатки. Это расстройство можно лечить путем внутриглазного (например, в стекловидное тело) введения векторов доставки согласно изобретению, кодирующих один или несколько нейротрофических факторов, и/или внутриглазного или периокулярного (например, в субтенозову области) введения одного или нескольких антиангиогенных факторов.

Глаукома характеризуется повышенным глазным давлением и потерей ганглиозных клеток сетчатки. Лечение глаукомы включает введение одного или нескольких нейропротекторных средств, которые защищают клетки от эксцитотоксического повреждения с использованием векторов доставки согласно изобретению. Такие средства включают антагонисты N-метил-D-аспартата (NMDA), цитокины и нейротрофические факторы, доставляемые внутриглазно, необязательно интравитреально.

Согласно другим вариантам осуществления настоящее раскрытие можно использовать для лечения припадков, например, для уменьшения возникновения, частоты или тяжести припадков. Эффективность терапевтического лечения припадков можно оценивать с помощью поведенческих (например, по дрожанию, тикку глаз или рта) и/или электрографических средств (большинство припадков имеют характерные электрографические аномалии). Таким образом, раскрытие также можно использовать для лечения эпилепсии, которая отмечается множеством припадков с течением времени.

Согласно одному типовому варианту осуществления соматостатин (или его активный фрагмент) вводят в мозг с использованием вектора доставки согласно настоящему изобретению для лечения опухоли гипофиза. Согласно этому варианту

осуществления вектор доставки, кодирующий соматостатин (или его активный фрагмент), вводят путем микроинфузии в гипофиз. Кроме того, такое лечение можно использовать для лечения акромегалии (аномальная секреция гормона роста из гипофиза). В данной области известны нуклеиново-кислотные (например, инвентарный номер GenBank J00306) и аминокислотные (например, инвентарный номер GenBank P01166; содержит обработанные активные пептиды соматостатин-28 и соматостатин-14) последовательности соматостатинов.

Согласно отдельным вариантам осуществления вектор может содержать секреторный сигнал, как описано в патенте США № 7071172.

Согласно типовым вариантам осуществления изобретения вирусный вектор и/или вирусный капсид вводят в ЦНС (например, в головной мозг или в глаз). Вирусный вектор и/или капсид можно вводить в спинной мозг, мозговой ствол (продолговатый мозг, варолиев мост), средний мозг (гипоталамус, таламус, эпителиальный, гипофиз, черную субстанцию, шишковидную железу), мозжечок, передний мозг (желтое тело, мозг, в том числе затылочную, височную, теменную и лобную доли, кору головного мозга, базальные ганглии, гиппокамп и миндалевидное тело), лимбическую систему, неокортекс, стриатум, головной мозг и нижний холмик четверохолмия. Вирусный вектор и/или капсид также можно вводить в различные области глаза, такие как сетчатка, роговица и/или зрительный нерв.

Вирусный вектор и/или капсид можно доставлять в спинномозговую жидкость (например, посредством люмбальной пункции) для более дисперсного введения вектора доставки. Кроме того, вирусный вектор и/или капсид можно вводить внутрисосудисто в ЦНС в ситуациях, когда нарушен гематоэнцефалический барьер (например, опухоль головного мозга или церебральный инфаркт).

Вирусный вектор и/или капсид можно вводить в требуемую область (области) ЦНС любым известным в данной области путем, включая, но без ограничения, интрацеребровентрикулярную, интрацистермальную, интрапаренхимальную, внутричерепную, интратекальную, внутриглазную, интрацеребральную, внутрижелудочковую, внутривенную (например, в присутствии сахара, такого как маннитол), интраназальную, внутриушную, внутриглазную (например, внутрь стекловидного тела, субретинальную, в переднюю камеру) и периокулярную (например, в субтеноновую область) доставку, а также внутримышечную доставку с ретроградной доставкой к двигательным нейронам.

Согласно отдельным вариантам осуществления вирусный вектор и/или капсид вводят в жидкой готовой форме путем прямой инъекции (например, стереотаксической инъекции) в требуемую область или отделение в ЦНС. Согласно другим вариантам осуществления вирусный вектор и/или капсид можно предоставить путем местного применения в требуемую область или путем интраназального введения аэрозольной готовой формы. Введение в глаза можно осуществлять путем местного нанесения капель жидкости. В качестве еще одной альтернативы вирусный вектор и/или капсид можно

вводить в виде твердой готовой формы с медленным высвобождением (см., например, патент США № 7201898).

Согласно дополнительным вариантам осуществления вирусный вектор можно использовать для ретроградной транспортировки для лечения и/или предотвращения заболеваний и расстройств, связанных с двигательными нейронами (например, бокового амиотрофического склероза (ALS); атрофии мышц позвоночника (SMA) и т.д.). Например, вирусный вектор можно доставлять в мышечную ткань, из которой он может мигрировать в нейроны.

Следующие примеры включены в настоящий документ только в целях иллюстрации и не предназначены для ограничения.

#### ПРИМЕРЫ

##### ПРИМЕР 1. ОТКРЫТИЕ НЕЙРОТРОПНОЙ ОБЛАСТИ УЗНАВАНИЯ, КОТОРАЯ ОБЕСПЕЧИВАЕТ ТРАНСПОРТИРОВКУ ААВ ЧЕРЕЗ ГЕМАТОЭНЦЕФАЛИЧЕСКИЙ БАРЬЕР

Аденоассоциированные вирусы (AAV) представляют собой непатогенные парвовирусы, состоящие из небольшого икосаэдрического капсида размером 25 нм, с упакованным одноцепочечным геномом ДНК размером приблизительно 4,7 т.п.н. Широкий спектр последовательностей капсид ААВов был выделен из тканей человека и приматов, которые были разделены на несколько отдельных клад на основании разнообразия последовательностей и структур. В этих кладах различные серотипы демонстрируют широкий тропизм на уровне видов, тканей и клеток. Эти разнообразные фенотипы определяются структурой капсида. Капсид ААВ собран из 60 субъединиц вирусного белка (VP). Основной мономер VP (VP3) имеет закрученную бета-бочкообразную структуру, состоящую из 7 антипараллельных бета-нитей, соединенных сомкнутыми участками петли. Части этих сильно изменяющихся петель имеют открытые поверхности и образуют топологию капсида ААВ, который, в свою очередь, определяет тропизм тканей, антигенность и использование рецепторов для различных серотипов ААВ. Остатки поверхностной петли на капсиде ААВ являются высокопластичными и поддаются модификации, обеспечивая регулирование антигенности, профиля трансдукции и тропизма ткани.

Первым шагом в жизненном цикле ААВ является распознавание и прикрепление к гликановым рецепторам клеточной поверхности. К ним относятся гепарансульфат (HS) для ААВ2, ААВ3 и ААВ6,  $\alpha 2,3$ - и  $\alpha 2,6$ -N-связанная сиаловая кислота (Sia) для ААВ1, ААВ5 и ААВ6, O-связанная сиаловая кислота для ААВ4 и галактоза (Gal) для ААВ9. На фоне связывания с гликаном клеточное поглощение ААВ вовлекает вторичные корецепторы, включая рецепторы различных факторов роста, а также интегрины. Недавно трансмембранный белок KIAA0319L (AAVR) был идентифицирован как универсальный рецептор для множества серотипов ААВ. Эти факторы, наряду с профилями гликозилирования тканей, способствуют изменению тропизма тканей различных серотипов ААВ. В частности, в отношении ЦНС, различные серотипы ААВ

демонстрируют спектр профилей трансдукции и клеточных тропизмов в зависимости от пути введения. Например, при прямом введении в ЦНС мыши с помощью либо прямой внутримышечной инъекции, либо посредством спинномозговой жидкости (CSF) капсиды AAV подвергаются аксональной транспортировке и транссинаптическому распространению в антероградном и/или ретроградном направлениях, в зависимости от серотипа. Кроме того, недавно авторы показали, что глиальный ассоциированный лимфатический (глимфатический) транспорт CSF влияет на распространение AAV в паренхиме головного мозга мыши и выведение из ЦНС.

Чтобы достичь переноса гена ЦНС, внутривенно вводимые векторы AAV сначала должны пересечь гематоэнцефалический барьер (BBB), чтобы попасть в мозг. Состоящий из плотных соединений эндотелиальных клеток, а также связанных астроцитарных синоптических нервных окончаний и перицитов, BBB блокирует диффузию и парацеллюлярный поток макромолекул/частиц и регулирует транспорт других молекул. Большинство вирусов, которые заражают головной мозг, делают это путем разрушения или ослабления BBB; однако некоторые вирусы разработали стратегии для проникновения в ЦНС такими способами, как передвижение внутри иммунных клеток хозяина (например, ВИЧ), путем инфицирования эндотелиальных клеток головного мозга или путем заражения периферических нервов и использования аксонального транспорта (например, вирусы бешенства). В случае AAV BBB предотвращает проникновение большинства серотипов в мозг с несколькими заметными исключениями. Например, внутрисосудистое введение серотипов 1–6 и 8 AAV приводит к плохой трансдукции ЦНС, в то время как изоляты AAV9, AAVrh.8 и AAVrh.10, среди прочего, показали, что они эффективно проходят BBB на разных животных моделях.

Чтобы достичь терапевтических уровней экспрессии трансгена в ЦНС, часто требуются высокие дозы векторов (например,  $1 \times 10^{14}$  vg/kg в исследовании мышечной атрофии позвоночника NCT02122952). В дополнение к бремени, связанному с увеличением масштабов и стоимости, также было показано, что высокие дозы векторов вызывают нежелательные побочные эффекты, такие как токсичность для печени. Чтобы улучшить специфичность/эффективность переноса генов в ЦНС и снизить эффективную дозу векторов, необходимо лучшее понимание структурных особенностей, которые позволяют капсидам AAV проникать через BBB.

Чтобы проанализировать структурно-функциональные связи для преодоления BBB, авторы создали комбинаторную библиотеку вариантов генов капсида, используя только два серотипа – AAV1, который не пересекает сосудистую сеть, и AAVrh.10, который, как известно, эффективно пересекает BBB. Вместо того, чтобы разрабатывать новые варианты, авторы выбрали отдельные варианты с помощью компьютерного, филогенетического и структурного анализа для дальнейшего скрининга у мышей.

Генерирование панели химерных капсидов AAV.

Библиотеку капсидов с замененными доменами AAV1/rh.10 создали путем перестановки ДНК. Вкратце, гены Cap AAV1 и AAVrh.10 случайным образом

фрагментировали путем кратковременного расщепления ДНКазой и повторно собирали с использованием ПЦР без праймера с помощью ДНК-полимеразы Phusion High-Fidelity (NEB Cat # M0530L), в которой частичная гомология коротких (<400 т.п.н.) фрагментов допускает саморегулирование фрагментов. Затем использовали вторичную стадию ПЦР с использованием специфических консервативных праймеров, фланкирующих ген *Cap*, для амплификации библиотеки повторно собранных полноразмерных последовательностей *Cap* и одновременной вставки фланкирующих сайтов рестрикции для облегчения последующего клонирования в каркас плазмиды pTR, используемой для продуцирования вируса.

#### Филогенетический анализ и анализ последовательностей

Аминокислотные последовательности различных изолятов капсидов AAV выравнивали с использованием ClustalW, а филогенетические деревья получали с использованием пакета программ MEGA v7.0.21. Филогении получали с использованием алгоритма соединения соседних пар, а расстояния между аминокислотами рассчитывали с использованием поправки Пуассона. Статистическое тестирование выполняли путем бутстреп метода с 1000 повторов, чтобы проверить достоверность филогенетического анализа и создать бутстреп консенсусное дерево. Сворачивали ветви, соответствующие разделам, воспроизведенным менее чем в 50% копий начальной загрузки. рядом с ветвями отображают процент повторяющихся деревьев, в которых связанные таксоны сгруппированы вместе в бутстреп-тесте. Все выравнивания последовательностей выполняли с использованием программного обеспечения Invitrogen Vector NTI Advance 11.5.2.

#### Получение и Титры Вирусов

Для получения рекомбинантных векторов AAV использовали обновленный протокол тройной плазмидной трансфекции. В частности, трансфицированные плазмиды включают (i) капсид-специфичную плазмиду-помощник pXR (т.е. pXR1, pXRrh.10 или различные плазмиды, кодирующие различные химерные гены *Cap*, использованные в этом исследовании), (ii) аденовирусную плазмиду-помощник pXX680 и (iii) плазмиды pTR-SBh-scGFP или pTR-SBA-Luc (кодирующие либо самокомплементарный репортерный трансген зеленого флуоресцентного белка (GFP), управляемый промотором куриного бета-актинового гибрида (SBh), либо репортерный трансген люциферазы (Luc), управляемый с помощью бета-актинового промотора цыпленка (SBA), соответственно, фланкированного инвертированными концевыми повторами (TR), полученными из генома AAV2. Вирусные векторы очищали с использованием ультрацентрифугирования в градиенте плотности йодиксанола. Векторы с упакованным трансгеном SBh-scGFP впоследствии подвергали буферному обмену и концентрированию с использованием центрифугирующих колонок Sartorius Vivaspin2 с отсечкой молекулярной массы 100 кДа (MWCO) (F-2731-100 Bioexpress, Kaysville, UT). Векторы с упакованным трансгеном SBA-Luc подвергали буферному обмену и обессоливанию с использованием центробежных опреснительных колонн Zeba, 40K MWCO (Thermo Scientific, кат. №

87770). После очистки титры вирусного генома определяли с помощью количественной ПЦР с использованием Roche Lightcycler 480 (Roche Applied Sciences, Pleasanton, CA). Количественные ПЦР–праймеры были разработаны для специфического распознавания инвертированных концевых повторов AAV2 (прямой, 5'–AACATGCTACGCAGAGAGGGAGTGG–3'; (SEQ ID NO: 36) обратный, 5'–CATGAGACAAGGAACCCCTAGTGATGGAG–3') (SEQ ID NO: 37) (IDT Technologies, Ames IA).

#### Исследования на животных

Все эксперименты на животных проводились с использованием самок мышей C57/BL6 в возрасте от 6 до 8 недель, приобретенных в Jackson Laboratories (BAR Harbour, ME). Этих мышей содержали и обрабатывали в соответствии с руководящими принципами NIH и в соответствии с утвержденным Комитетом ООН по уходу за животными и их использованию (IACUC). Чтобы исследовать способность векторов AAV преодолевать BBB и трансдуцировать клеточные популяции ЦНС, векторы AAV с упакованным трансгеном CBh–scGFP или 1x PBS (в качестве имитации лечения), вводили внутривенно (в/в) путем инъекции в хвостовую вену в дозе  $5 \times 10^{11}$  vg. Для анализа экспрессии трансгена репортера GFP животных умерщвляли через 21 день после инъекции трибромэтанола (авертин) (0,2 мл 1,25% раствора) с последующей транскардиальной перфузией 30 мл 1x PBS с последующим добавлением 30 мл 4% параформальдегида в PBS. Ткани, включая головной мозг, сердце и печень, удаляли и после фиксировали в течение 24 часов, и для каждой ткани получали срезы толщиной 50 мкм с использованием микротомы с вибрирующим лезвием Leica VT 1200S (Leica Biosystems, IL). Затем срезы головного мозга мыши иммунокрашивали, как описано ниже. В экспериментах *in vivo* по трансдукции люциферазы и биораспределению вирусного генома мышам вводили либо 1x PBS, либо вирусные векторы с упакованным трансгеном CBA–люциферазы в дозе  $1 \times 10^{11}$  vg. Мышей умерщвляли, как описано выше, через 14 дней после инъекции, и различные ткани удаляли. В этих экспериментах не проводили фиксацию с помощью 4% параформальдегида в 1x PBS, и вместо этого ткани иссекали и замораживали при  $-80^{\circ}\text{C}$  перед использованием.

Для количественной оценки экспрессии люциферазы мышей, которым инъекцировали  $1 \times 10^{11}$  вирусных геномов с упакованным трансгеном CBA–Luc, умерщвляли через 14 дней после инъекции, а ткани собирали и замораживали при  $-80^{\circ}\text{C}$ . Позже ткани оттаивали, взвешивали и лизировали, добавляя 150 мкл 2x пассивного буфера для лизиса (Promega, Madison WI) до механического лизиса с использованием прибора Tissue Lyser II 352 (Qiagen, Valencia, CA) с последующим центрифугированием для удаления остатков ткани. Чтобы измерить экспрессию трансгена люциферазы, 50 мкл супернатанта из каждого лизата затем загружали на планшет для анализа вместе с 50 мкл люциферина и проводили люминометрический анализ с использованием люминометра Victor2 (PerkinElmer, Waltham, MA). Относительные световые единицы, полученные для каждого образца, были затем нормализованы по отношению к входному весу ткани для

каждого образца, измеренному в граммах. Собирали данные, и проводили статистический анализ с использованием непарного двустороннего Т-критерия с коррекцией Уэлча, а также ANOVA, за которым следовал тестом множественных сравнений Тьюки, где это указано. Эти статистические анализы проводили с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 6®.

#### Обработка тканей и гистологический анализ

Для экспериментов на мышах с использованием упаковки в вирус репортерного трансгена GFP свободно плавающие коронарные срезы головного мозга толщиной 50 мкм окрашивали в 24-луночных планшетах. Срезы инкубировали в блокирующем буфере, содержащем 10% козьей сыворотки и 1% Triton X (Sigma-Aldrich) в 1x PBS в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем срезы инкубировали при 4°C в течение ночи с первичным моноклональным кроличьим антителом к  $\alpha$ -GFP (Life-Technologies-G10, 362 1: 750), разведенным в блокирующем буфере. На следующий день выполняли три 10-минутные промывки 1x PBS. Последующий гистохимический анализ экспрессии GFP проводили с использованием набора Vectastain ABC (набор Rabbit IgG PK-4001, Vector biolabs, Burlingame, CA), и ткани помещали на предметные стекла для микроскопии. Иммуноокрашенные срезы получали в цифровом виде в светлом поле (объектив 20x) с использованием прибора Aperio ScanScope XT (Aperio Technologies, Vista, CA) лаборатории трансляционной патологии ООН, а изображения получали с использованием Leica eSlide Manager (программное обеспечение для централизованного хранения изображений и управления данными) и анализировали с использованием программ Aperio ImageScope и WebViewer. Количественные оценки рассчитывали путем подсчета количества GFP+нейрональных или глиальных клеток, определенных на основе морфологии, на 50 мкм коронарного среза головного мозга. Собирали данные, и выполняли статистический анализ, как указано выше. Идентифицировали конкретные области головного мозга на основе сравнения с эталоном головного мозга мыши, полученным из атласа головного мозга мыши Аллена. Для анализа экспрессии GFP в сердце и печени ткани окрашивали на GFP первичным антителом против GFP, как описано выше; однако в качестве вторичного антитела использовали анти-кроличьи козы антитела, конъюгированные с Alexa-488, в разведении 1:500 (анти-кроличьи Abcam-96,883). Иммуноокрашенный GFP в этих тканях затем визуализировали с использованием системы визуализации эпифлуоресцентных клеток EVOS FL (AMC/Life Technologies) с использованием светового куба GFP (возбуждение 470 нм, излучение 510 нм). Статистический анализ проводили, как указано ранее.

#### Биораспределение векторного Генома

Исследования на животных проводили, как описано выше. Через 21 день после инъекции мышей умерщвляли, и ткани замораживали при -80°C. Позже ткани оттаивали, и вирусные геномы извлекали из лизатов ткани с использованием набора DNeasy (Qiagen, Valencia, CA). Затем для каждой ткани определяли количество копий вирусного генома, используя количественную ПЦР с праймерами, специфичными для трансгена люциферазы



(прямой, 5'-AAAAGCACTCTGATTGACAAATAC-3' (SEQ ID NO: 38) и обратный, 5'-CCTTCGCTTCAAAAAATGGAAC-3' (SEQ ID №: 39)). Эти количества копий вирусного генома затем нормализовали по гену домашнего хозяйства в ламине B2 мыши с использованием праймеров (прямой, 5'-GGACCCAAGGACTACCTCAAGGG-3' (SEQ ID NO: 40) и обратный, 5'-AGGGCACCTCCATCTCGGAAAC-3' (SEQ ID NO : 41)). Биораспределение вирусных геномов представлено как соотношение векторных геномов на клетку, выделенных для каждой ткани. Данные изображали на графике, а статистический анализ проводили, как описано ранее.

#### Молекулярное моделирование

Ранее опубликованные координаты (PDB ID, 3NG9) использовали для создания трехмерных структур AAV1 VP3 тример/ось симметрии 3 порядка. Гомологичные модели AAVrh.10 и различных структур химерных капсидов AAV1/rh.10 получали с использованием сервера SWISS-Model ([swissmodel.expasy.org](http://swissmodel.expasy.org)) с кристаллической структурой AAV8 VP3 (PDB ID, 2QA0), используемой в качестве матрицы, и выравнивание на основе структуры создавали с использованием приложения сопоставления вторичных структур (SSM) в программном обеспечении WinCoot, причем в качестве матрицы использовали мономер AAV1 VP3 (PDB ID 3NG9). Тримеры VP3/оси симметрии 3 порядка, димеры тримера VP3/оси симметрии 2 порядка, пентамеры VP3/оси симметрии 5 порядка и полные капсиды создавали с использованием утилиты генератора олигомеров VIPERd ([viperdb.scripps.edu/oligomer\\_multi.php](http://viperdb.scripps.edu/oligomer_multi.php)). Представленные изображения поверхности этих моделей визуализировали с использованием PyMOL (система молекулярной графики PyMOL, Schrödinger LLC, [www.pymol.org](http://www.pymol.org)). Стереорафические перспективные проекции поверхности капсидов AAV1RX с выделением поверхностно открытых аминокислотных остатков в пределах нейротропной области узнавания, полученных из AAVrh.10, создавали с использованием программного обеспечения RIVEM (Radial Interpretation of Viral Electron Density Maps).

Создание библиотеки замен доменов AAV1/rh.10 и выделение вариантов химерных капсидов

Авторы провели сравнительный анализ различных капсидных доменов, чтобы установить структурно-функциональные связи для прохождения BBB. Авторы создали библиотеку замен доменов AAV1/rh.10 путем перетасовки ДНК. Авторы выбрали AAV1 и AAVrh.10 в качестве родительских капсидных последовательностей для перетасовки ДНК, поскольку они заметно отличаются по своим способностям преодолевать BBB и из-за гомологии последовательностей (85%), общих для генов (Cap) их капсидов. Тридцать шесть последовательностей химерных капсидов затем клонально выделяли и секвенировали. Варианты, полученные из этой библиотеки, демонстрировали значительное разнообразие на уровне ДНК и аминокислот. Выравнивание последовательностей выявило спектр замен доменов, которые авторы затем организовали в порядке увеличения гомологии от AAV1 до AAVrh.10 (фиг. 4А, сверху вниз). Эту группа клонов дополнительно охарактеризовали филогенетически путем построения

дерева по методу объединения соседних пар, которое широко классифицировало эти варианты либо как более похожие на AAV1 (Клад А) либо более похожие на AAVrh.10 (Клад Е) (фиг. 4В). Затем для определения относительных титров использовали получение векторов в небольших масштабах, чтобы исключить из исследования дефектные при сборке или упаковке капсиды. Чтобы дополнительно сузить список вариантов химерного капсида для первоначального скрининга *in vivo* создавали основанные на гомологии структурные модели родительского и репрезентативного тримеров химерных капсидов с выделением ключевых доменов/остатков поверхности на оси симметрии 3 порядка (фиг. 4С). На основе структурного анализа отобрали десять вариантов химерных капсидов, из которых шесть дали рекомбинантные векторы (с упаковкой кассеты трансгенов scGFP или ssLuc) с титрами, похожими на родительские векторы AAV1 и AAVrh.10. Затем эти варианты проверяли дальше.

Скрининг *in vivo* идентифицирует два химерных капсида AAV1/rh.10, способных преодолевать BBB после внутривенного введения взрослым мышам.

Затем авторы проверили, будут ли выбранные панели вариантов капсида различаться по их способности преодолевать BBB и преобразовывать ЦНС после в/в введения. Важно отметить, что подход авторов не включал направленную эволюцию, поскольку эта стратегия обычно применима для выбора оптимальных капсидов и менее подходит для изучения структурно-функциональных отношений. Авторы вводили 6–8-недельным мышам дозу  $5 \times 10^{11}$  вирусных геномов (vg) на мышь AAV1, AAVrh.10 или одного из шести различных химерных векторов AAV с упакованной самокомплементарной репортерной кассетой CBh-GFP через инъекцию в хвостовую вену.

GFP-положительные нейроны в коре головного мозга подсчитывали вручную, количественно определяли и усредняли по множеству коронарных срезов головного мозга на мышь.  $n=2$  для AAV1;  $n=3$  для AAV1R6 и AAV1R7 (фиг. 1). Иммуноокрашивание коронарных срезов головного мозга через три недели после инъекции показало, что трансдукция AAV1 в коре головного мозга была ограничена сосудистой сетью, в то время как AAVrh.10 продемонстрировал надежную трансдукцию различных популяций клеток, включая нейроны, глию и эндотелиальные клетки, что определено морфологически (фиг. 2, фиг. 5). Дальнейшая морфологическая оценка GFP+ клеток указывает на различные фенотипы для химерных вариантов. AAV1R19.1 и AAV1R20 трансдуцируют преимущественно в микрососудистые эндотелиальные клетки в коре головного мозга, тогда как трансдукция нейрональных и глиальных клеток от низкой до умеренной очевидна для векторов AAV1R8 и AAV1R19d (фиг.5). Напротив, AAV1R6 и AAV1R7 демонстрируют надежную трансдукцию кортикальных нейронов с умеренной трансдукцией глии и редкой, если таковая имеется, трансдукцией сосудистой сети в коре. Представлены типичные изображения соматосенсорной области коры при большом увеличении. Аналогичная тенденция для этих химер наблюдалась последовательно в других областях головного мозга (фиг. 6). Эти наблюдения показывают, что химерные капсиды AAV1R6 и AAV1R7, вероятно, обладают способностью преодолевать BBB,

подобно родительскому вектору AAVrh.10, хотя механизм неизвестен. Однако, в отличие от любого из родителей, AAV1 или AAVrh.10, ни одна химера эффективно не трансдуцирует сосудистую сеть.

Внутривенно доставленные химерные капсиды AAV1R6 и AAV1R7 преодолевают BBB и трансдуцируют нейроны преимущественно по всему головному мозгу.

Затем авторы дополнительно охарактеризовали профили трансдукции этих вариантов для множества функционально значимых структур головного мозга. Для каждой из областей головного мозга, обсуждаемых ниже, репрезентативные изображения при более высоком увеличении получали из коронарных срезов головного мозга мыши, иммуноокрашенных на GFP, и сканировали в светлом поле при 20-кратном увеличении. Кроме того, количественные данные для нейрональной и глиальной трансдукции для каждой области определяли путем подсчета GFP+ нейрональных и глиальных клеток, соответственно, на основе клеточной морфологии.

Кора головного мозга. AAVrh.10 демонстрирует устойчивую трансдукцию нейрональных, глиальных и сосудистых эндотелиальных клеток по всей коре, и, в случае внутрисосудистой доставки AAV1, наблюдалась сосудистая трансдукция, сопровождающаяся отсутствием нейрональной экспрессии и низкими уровнями экспрессии в глии (фиг. 7 и фиг. 8). Авторы также наблюдали, что внутривенно вводимые векторы AAV1R6 и AAV1R7 (AAV1R6/7) обеспечивают устойчивую экспрессию GFP в кортикальных нейронах и снижают экспрессию в глии на всем протяжении миндалевидной, грушевидной, энторинальной, височной ассоциации, слуховой, соматосенсорной, моторной, задней теменной и ретроспленальной областей коры, также с изменением последовательно изменяющихся уровней по анализируемым участкам. Репрезентативные изображения трансдуцированных областей коры показаны для моторной коры (фиг. 7A) и соматосенсорной области коры (фиг. 7B). Кроме того, AAV1R6/7, по-видимому, демонстрирует преимущественно нейрональный клеточный тропизм по всей коре, показывая умеренную глиальную трансдукцию и заметно сниженную сосудистую трансдукцию. Этот профиль резко контрастирует с васкулотропным AAV1, а также AAVrh.10, который с высокой эффективностью трансдуцирует нейрональные, глиальные и сосудистые эндотелиальные клетки (фиг. 7A и 7B). В то время как AAV1R6/7 обеспечивают устойчивую нейрональную и умеренную глиальную экспрессию во всей коре, тем не менее их уровни экспрессии ниже, чем уровни, достигнутые AAVrh.10. Эти тенденции подтверждаются количественным анализом морфологического анализа авторами клеток GFP + (фиг. 8A и 8B), которые показывают статистически значимое различие в кортикальной трансдукции относительно AAV1 для AAVrh.10, AAV1R6 и AAV1R7. Последнее отличие, которое следует отметить, заключается в том, что трансдукция AAVrh.10 через кору имеет тенденцию концентрации на периферии ткани, вокруг кортикальных слоев 1–3, особенно в ретроспленальной, моторной, соматосенсорной и зрительной кортикальных областях. Хотя это может быть связано с дифференциальным иммуноокрашиванием, при анализе авторы наблюдали это

явление с высокой последовательностью на окрашенных срезах AAVrh.10. Эта тенденция не распространяется на AAV1R6/7, которые, по-видимому, обеспечивают более равномерно распределенную экспрессию по кортикальным слоям.

**Гиппокамп.** После внутривенной доставки химерные векторы AAV1R6/7, по-видимому, опосредуют устойчивую экспрессию GFP в нейронах по всему гиппокампу, с двух сторон по полушариям головного мозга. GFP+ нейроны гиппокампа наблюдаются в пирамидальных слоях CA1, CA2 и CA3 (показаны на фиг. 7C, CA2 и частично CA1). AAV1R6/7 также, по-видимому, эффективен для трансдукции нейронов в зубчатой извилине, показывая большое количество GFP+ нейронов, которые, по-видимому, являются зернистыми клетками на основании морфологии (фиг. 7D). Профиль нейрональной трансдукции, отображаемый AAV1R6/7 в гиппокампе, аналогичен профилю, наблюдаемому для AAVrh.10. однако, в отличие от AAVrh.10, AAV1R6/7, по-видимому, не трансдуцирует ни глиальные, ни эндотелиальные клетки ни в одной области на каком-либо заметном уровне, при этом не наблюдается значительного различия в GFP+ глиальных клетках между AAV1 и AAV1R6/7 (фиг. 8C и 8D). Трансдукция AAV1, наблюдаемая в гиппокампе, снова ограничивается сосудистой системой. Кроме того, эти качественные тренды подтверждаются количественными данными для трансдукции нейронов и глиальных клеток в гиппокампе (фиг. 8C) и зубчатой извилине (фиг. 8D).

**Таламус.** GFP+ нейроны были обнаружены в таламусе для AAV1R6/7 на уровнях, сопоставимых с AAVrh.10 (фигура 7E). Кроме того, AAV1R6/7 демонстрируют минимальную трансдукцию эндотелия и резко снижают уровни глиальной трансдукции в таламусе по сравнению с AAVrh.10. Эти тенденции дополнительно подтверждаются количественными данными (фиг. 8E), в которых было обнаружено, что трансдукция нейронов таламуса значительно отличается для AAVrh.10, AAV1R6 и AAV1R7 по сравнению с AAV1. Наоборот, не было обнаружено существенного различия для глиальной трансдукции таламуса для AAV1R6/7 относительно AAV1.

**Гипоталамус.** Несмотря на некоторую вариабельность, авторы наблюдали стабильно низкие уровни экспрессии GFP, независимо от типа клеток, в гипоталамусе для родительских и химерных векторов при системном введении (фиг. 7F). Изменения уровней нейрональной трансдукции в гипоталамусе наблюдались для AAVrh.10, обнаруживая как высокое, так и низкое количество GFP+ нейронов у мышей. Этот профиль трансдукции иллюстрируется отклонением, показанным для трансдукции AAVrh.10 в количественных данных авторов (фиг. 8F). AAV1 показывает умеренную трансдукцию гипоталамуса, которая ограничена сосудистой системой. Векторы AAV1R6/7 демонстрируют низкое количество GFP+ нейронов и глиальных клеток в гипоталамусе и небольшое количество GFP+ эндотелиальных клеток (фиг. 7F и фиг. 8F).

**Стриатум.** AAV1R6/7 трансдуцируют нейроны в стриатуме (в частности, дорсолатеральном отделе стриатума) так же эффективно, как AAVrh.10 (фиг. 7G), что подтверждается количественными данными авторов, демонстрирующими значительную разницу для каждого относительно AAV1; однако эти векторы трансдуцируют примерно в

2 раза меньше глиальных клеток и меньшее количество эндотелиальных клеток в стриатуме (фиг. 8G), несмотря на некоторые наблюдаемые изменения.

Миндалины. Профили трансдукции миндалин для AAV1R6/7 показывают устойчивую нейронную экспрессию GFP, значительно отличающуюся от AAV1. Было обнаружено небольшое количество GFP<sup>+</sup> глиальных клеток, которые существенно не отличались от AAV1 (фиг. 7H и фиг. 8H), и были обнаружены едва детектируемые GFP<sup>+</sup> эндотелиальные клетки, аналогично другим областям головного мозга, таким как стриатум и таламус.

Взяты вместе, морфологическая оценка иммуноокрашенных участков головного мозга, полученных у мышей после внутривенной доставки AAV1R6 и AAV1R7, демонстрирует надежную и селективную нейронную трансдукцию, сравнимую с родительским AAVrh.10. Кроме того, у этих химер снижена глиальная трансдукция, и снижена их способность трансдуцировать эндотелиальные клетки микроциркуляторного русла головного мозга. Кроме того, эти результаты, по-видимому, согласуются между различными областями головного мозга, за исключением гипоталамуса, где в целом наблюдаются низкие уровни трансдукции.

AAV1R6 и AAV1R7 не нацелены на печень при сохранении родительских профилей трансдукции сердца

Авторы проанализировали относительную трансдукцию сердца и печени этих вариантов по сравнению с родительскими серотипами с помощью иммуноокрашивания срезов сердца и печени. Самкам мышей BL6 в возрасте 6–8 недель системно вводили инъекции в хвостовую вену в дозе  $5 \times 10^{11}$  vg векторов с упакованным гибридным промотором бета-актина курицы (CBh), связанным с кодирующей последовательностью (CBh-scGFP) зеленого флуоресцентного белка (GFP) (или AAV1, AAV1R6 или AAV1R7) или с PBS в качестве отрицательного контроля. Мышей забивали через 21 день после инъекции, а ткани собирали, фиксировали и рассекали. Микроскопию использовали для визуализации трансдукции репортера GFP. Экспрессию GFP количественно определяли путем усреднения относительной флуоресценции для нескольких изображений на мышь с использованием программного обеспечения ImageJ. n=1 для макета, n=2 для AAV1 и n=3 для AAV1R6 и AAV1R7.

Как показано на фиг. 10, оба химерных вектора демонстрируют сравнимые уровни экспрессии GFP в сердце относительно родительских серотипов, AAV1 и AAVrh.10, без существенных различий, обнаруженных для AAVrh.10, AAV1R6 или AAV1R7, относительно AAV1; однако уровни экспрессии AAVrh.10 в сердечной ткани показали значительные различия у мышей (фиг. 10A и 10B). В печени AAV1 продемонстрировал умеренные уровни трансдукции, в то время как AAVrh.10 продемонстрировал исключительно хорошие результаты, демонстрируя в 10 раз более высокую трансдукцию. Напротив, AAV1R6 и AAV1R7 опосредовали пренебрежимо малую экспрессию GFP в печени на фоновых уровнях, сравнимых с мышами, получавшими ложное лечение (фиг. 10B), которые были значительно снижены по сравнению с AAVrh.10. Таким образом,

авторы пришли к выводу, что AAV1R6 и AAV1R7 не нацелены на печень по сравнению с их родительскими серотипами.

Отдельно AAV–векторы с упакованным промотором куриного бета–актина (CBA), связанным с кодирующей люциферазу последовательностью, для получения трансгена CBA–люциферазы, вводили мышам C57/Bl6 путем инъекции в хвостовую вену в дозе  $1 \times 10^{11}$  vg. Мышей умерщвляли через 14 дней после инъекции, ткани собирали, измельчали, лизировали, и выполняли анализы на люциферазу для определения относительных уровней трансдукции для тканей головного мозга, сердца, печени и спинного мозга. Данные нормализовали как относительные световые единицы на грамм ткани. В головном мозге AAV1R6, AAV1R7 и AAV1RX демонстрируют значительные уровни трансдукции, хотя и не такие высокие, как AAVrh.10 (фиг.3). Химерные капсиды дополнительно показывают уровни трансдукции, сравнимые с родительскими капсидами AAV1 и AAVrh.10 в сердце. В спинном мозге уровни трансдукции для химер, по–видимому, являются промежуточными между родителями. Неожиданно, эти данные дополнительно демонстрируют, что AAV1R6, AAV1R7 и AAV1RX, все не нацелены на печень. N=3.

Структурный анализ химерного капсида AAV1R6 идентифицирует три потенциальных домена из AAVrh.10, которые могут обеспечить преодоление BBB

Анализ последовательностей показал, что AAV1R6 на 97–98% идентичен AAV1 с 18 уникальными аминокислотными остатками, полученными из AAVrh.10. AAV1R7 также в значительной степени идентичен AAV1, но имеет в общей сложности 22 остатка, полученных из AAVrh.10, включая 18, присутствующих в AAV1R6. Из 4 дополнительных остатков, уникальных для AAV1R7, два находятся в уникальной N–концевой области VP1 (VP1u) (189I, 206A), а два других находятся в скрытой N–концевой области VP3 (224S и 225S). Поскольку эти остатки не открыты на поверхности капсида, и поскольку данные *in vivo* предполагают, что профили трансдукции, отображаемые AAV1R6 и AAV1R7, являются эквивалентными (фиг. 7 и 8), авторы исключили AAV1R7 из оставшейся части своего анализа и сосредоточились только на AAV1R6.

AAV1R6 имеет 3 участка непоследовательных остатков, полученных из родительского штамма AAVrh.10. Первая группа остатков (группа i) включает три аминокислоты (148P, 152R и 153S) в области VP1u (фиг. 9A). В частности, один остаток расположен рядом с основной областью 1 (BR1), которая содержит первый сигнал ядерной локализации (NLS) VP1. Кроме того, группа i содержит два остатка (158T и 163K) также вблизи NLS, расположенные в N–концевой области VP2 (фиг. 9A). Как упоминалось ранее, эти остатки не открыты на поверхности и вместо этого остаются интернализированными в капсиде до последнего времени на пути внутриклеточной миграции.

Вторая группа остатков, полученных из AAVrh.10, на AAV1R6 (группа ii), состоит из 8 аминокислот, составляющих петлю BC, расположенную в вариабельной области I (VR–I) (фиг. 9A и 9B). Эти остатки открыты на поверхности капсида у основания выступов по оси симметрии 3 порядка (фиг. 9D и 9F), а также локализованы в углублении

по оси симметрии 2 порядка (фиг. 9C и 9F). Также важно отметить, что эта группа аминокислотных остатков на AAVrh.10 замещена остатками AAV1 в химерных капсидах AAV1R8/19/20, которые не способны проникать в ЦНС после системного введения.

Третья группа остатков, полученных из AAVrh.10, присутствующих в AAV1R6 (группа iii), включает в общей сложности 6 аминокислот. Четыре из этих остатков (328Q, 330E, 332T и 333K) расположены в VR-II внутри петли DE, что способствует образованию поры на оси симметрии 5 порядка (фиг. 9A, 9B, 9E, 9F). Последние два оставшихся остатка в этой группе (343I и 347T) расположены внутри  $\beta$ -цепи E, расположенной внутри капсида (фиг. 9A и 9B). Хотя эти остатки различаются между AAV1 и AAVrh.10, следует отметить, что они относительно консервативны для разных серотипов AAV.

Рациональный дизайн AAV1RX, химерного капсида с минимальной областью узнавания из AAVrh.10 для преодоления BBB

Используя рациональный подход, авторы сузили минимальное количество аминокислотных остатков, полученных из AAVrh.10, в области узнавания 1R6, которые позволяют преодолеть BBB и придают тропизм ЦНС. Сначала авторы исключили любые аминокислоты, которые не были открыты на поверхности капсида, устраняя участки остатков, расположенных в N-терминальных областях VP1/2 последовательности капсида (148P, 152R, 153S, 158T и 163K). Используя то же обоснование, авторы также исключили остатки внутри консервативной  $\beta$ -цепи E (343I и 347T), а также те остатки внутри VR-II, которые представляют собой порообразующую петлю, соединяющую  $\beta$ -цепи D и E (328Q, 330E, 332T и 333K). Благодаря такому подходу для дальнейшей оценки была выбрана область узнавания, содержащая 8 аминокислот (263N, 264G, 265T, 266S, 268G (вставка относительно последовательности AAV1), 269S, 270T и 274T), обнаруженная в VR-I, петле, соединяющей  $\beta$ -цепи B и C, на AAV1R6 (фиг. 11A и 11B). Эти открытые на поверхности остатки расположены вблизи углубления на оси симметрии 2 порядка (фиг. 11C и 11F) и в основании тройных выступов (фиг. 11D и 11F). Стереографическая перспективная проекция открытых на поверхности остатков на оси симметрии 3 порядка подчеркивает топологическую ориентацию этих 8 остатков по отношению к окружающим аминокислотам на поверхности капсида (фиг. 11G). Как упоминалось ранее, авторы также принимали во внимание, что эти аминокислоты отсутствовали в вариантах AAV1R8/19/20, которые были неспособны трандуцировать паренхиму головного мозга после системного введения.

Затем авторы сконструировали химерный капсид, путем трансплантации 8 аминокислотных остатков из AAVrh.10 на серотип AAV1, назвав эту химеру AAV1RX. Авторы вводили самкам мышей C57/Bl6 в возрасте 6–8 недель векторы AAV1RX-CBh-scGFP в дозе  $5 \times 10^{11}$  vg на мышь через инъекцию в хвостовую вену. Экспрессию GFP-репортера в головном мозге оценивали с помощью иммуноокрашивания через 21 день после инъекции. Как видно на фиг. 11H, AAV1RX трандуцирует нейроны в моторной коре и кортикальные нейроны по всей коре, демонстрируя ограниченную трандукцию

глии и уменьшенную сосудистую трансдукцию, как это было ранее замечено для химерных капсидов AAV1R6 и AAV1R7. Продолжая эту тенденцию, в гиппокампе наблюдаются многочисленные GFP<sup>+</sup> пирамидальные нейроны и большое количество GFP<sup>+</sup> гранулированных клеток в зубчатой извилине. Примечательно, что GFP<sup>+</sup> глиальные и эндотелиальные клетки в этих областях в основном отсутствуют. В таламусе AAV1RX демонстрирует устойчивую нейронную трансдукцию на уровнях, сопоставимых с AAV1R6 и AAV1R7, с умеренной трансдукцией глиальных и эндотелиальных клеток, хотя и на уровнях выше, чем для других областей мозга. В гипоталамусе GFP<sup>+</sup> нейроны редки, и наблюдается небольшое количество GFP<sup>+</sup> глии и сосудистых эндотелиальных клеток. Наконец, преимущественно профиль нейрональной трансдукции, отображаемый с помощью AAV1RX, также виден в стриатуме (в частности, дорсолатеральном отделе стриатума) и миндалине (фиг.11H). Количественный анализ этих областей головного мозга и сравнение с анализом, полученным для векторов AAV1, AAVrh.10 и химерных векторов AAV1R6 и AAV1R7, подтверждают, что эта минимальная область узнавания из 8 аминокислотных остатков из AAVrh.10 является критической для преодоления BBB (фиг. 13).

AAV1R6, AAV1R7 и AAV1RX опосредуют низкие уровни трансдукции и биораспределения в периферических тканях.

Для проведения сравнительного анализа различных химерных капсидов с родительскими серотипами самкам мышей C57/Bl6 в возрасте 6–8 недель через хвостовую вену инъецировали векторы AAV1, AAVrh.10, AAV1R6, AAV1R7 или AAV1RX с упакованным одноцепочечным репортерным трансгеном люциферазы, управляемым куриным бета-актиновым промотором (ssCBA–Luc) в дозе  $1 \times 10^{11}$  vg на животное. Через 2 недели после инъекции мышей умерщвляли, а ткани собирали. Провели анализы активности люциферазы на лизаты тканей, а также анализы qPCR для определения биораспределения вектора (фигура 12). Все три химерных вектора обеспечивают более высокую экспрессию трансгена люциферазы, и соответствующее увеличение копий вирусного генома для каждого, наблюдается в головном мозге по сравнению с AAV1 (фиг. 12A и 12B). Однако их уровни экспрессии трансгена и количество копий вирусного генома в головном мозге были примерно в 2–3 раза ниже по сравнению с AAVrh.10, которые, как было установлено, были статистически значимыми, за исключением биораспределения AV1RX (фиг. 12A и 12Б). Аналогичные уровни трансдукции и количества копий вирусного генома наблюдались для AAV1R6, AAV1R7 и AAV1RX в сердце, сопоставимые с уровнями, наблюдаемыми для AAV1, несмотря на некоторые различия в уровнях трансдукции сердца, наблюдаемые для AAV1RX (фиг. 12C и 12D). AAVrh.10 опосредует ~ 2–4-кратную более высокую экспрессию сердечной люциферазы и соответственно ~ в 2 раза больше вирусных копий генома в сердце по сравнению с другими векторами (фиг. 12C и 12D). Как продемонстрировали другие группы, AAVrh.10 продемонстрировал в несколько раз более высокие уровни экспрессии трансгена люциферазы и стабильно много копий вирусного генома в печени. Напротив, низкие или



фоновые уровни экспрессии люциферазы и значительно меньше копий вирусного генома было обнаружено в печени для AAV1, 1R6, 1R7 и 1RX (фиг. 12E и 12F). Следует отметить, что экспрессия люциферазы и соответствующая тенденция в количестве копий вирусного генома были обнаружены для AAVrh.10 в почке (фиг. 12G и 12H). Хотя три химерных вектора показали сходные уровни числа копий вирусного генома, экспрессия люциферазы в почке отсутствовала. Взятые вместе, эти данные, по-видимому, предполагают, что химерные векторы AAV1R6, 1R7 и 1RX не нацелены на печень и могут быть выведены из кровообращения почкой.

После внутривенного введения авторы идентифицировали подмножество химерных капсидов, способных преодолевать BBB и эффективно трансдуцировать ЦНС. Было обнаружено, что способность преодолевать BBB обратно коррелирует с инфекционностью в культуре клеток и чувствительностью к нейраминидазе. Структурное моделирование и перспективный анализ также помогли идентифицировать несколько ключевых кластеров остатков в AAVrh.10, которые обеспечивают транспорт через сосудистую сеть головного мозга и широко распространенную нейронную трансдукцию. Впоследствии авторы смогли дополнительно сузить размер этой области узнавания с помощью подхода рационального мутагенеза, который затем функционально подтверждали *in vivo*. В заключение, авторы определили минимальную область узнавания из AAVrh.10, которая при пересадке на другие штаммы AAV обеспечивает транспортировку через BBB и обеспечивает более нацеленный профиль трансдукции ЦНС по сравнению с AAVrh.10. Кроме того, полученные капсиды не нацелены на сосудистую сеть головного мозга, печень и другие периферические ткани. Функциональное картирование этой новой нейротропной области узнавания обеспечивает перспективу для конструирования синтетических капсидов AAV для эффективного переноса генов ЦНС с улучшенным профилем безопасности.

AAV1 и AAVrh.10, родительские серотипы, использованные для создания химерной библиотеки капсидов в этом исследовании, являются изолятами нечеловеческих приматов, которые относятся к двум разным кладам – AAV1 относится к кладе А, тогда как AAVrh.10 относится к кладе Е. Несмотря на эволюционное расстояние между ними, они имеют ~ 85% гомологию последовательностей между их генами *Cap*. Известно, что AAV1 распознает N-связанную сиаловую кислоту (Sia), и недавно было сообщено о ключевых остатках, составляющих область узнавания Sia на капсиде AAV1. Текущее исследование идентифицировало 262N, 263G, 264T, 265S, 267G, 268S, 269T и 273T в качестве ключевых остатков на химерном капсиде AAV1RX, происходящем из AAVrh.10, которые необходимы для преодоления BBB. Хотя ни один из Sia-контактных остатков для AAV1 не находится в пределах химерной области узнавания 1RX, атомы карбонила кислорода каркаса остатков S268, D271 и N272 участвуют в возможной стабилизации взаимодействий капсид–гликан и повышении аффинности связывания Sia. Кроме того, остатки в этом положении (D271 и N272) находятся в пределах области связывания галактозы на AAV9. Таким образом, текущее исследование поддерживает идею, что

остатки в VR-I являются критическими.

Выравнивание последовательностей VP3 природных изолятов AAV показывает, что 8 аминокислотных остатков, которые придают ЦНС фенотип AAV1RX, являются консервативными в AAVrh.8 и AAVrh.39, других нейротропных капсидах в клетке E (фиг. 14). Точно так же AAV8 и AAVrh.43, также расположенные в Кладе E, демонстрируют способность преодолевать BBB, хотя и гораздо менее эффективно. Оба обладают 7 из 8 остатков в этой области; следовательно, введение полной области в эти капсиды, вероятно, увеличит их способность преодолевать BBB.

Фенотипически, AAV1 и AAVrh.10 заметно отличаются по своей способности преодолевать BBB и преобразовывать нейроны и глию в головном мозге. При внутривенном введении AAV1 демонстрирует преимущественное поглощение и трансдукцию в эндотелиальных клетках сосудов. Напротив, AAVrh.10, по-видимому, не только поглощается и трансдуцирует сосудистые эндотелиальные клетки, но также проходит через сосудистую сеть и трансдуцирует нижележащие ткани, такие как ЦНС или скелетные мышцы. Текущее исследование идентифицирует минимальный набор остатков на капсиде AAVrh.10, который частично придает эти признаки капсидам AAV1. В то время как эта минимальная область на химере AAV1RX, по-видимому, необходима для преодоления BBB и трансдукции нейронов, трансдукция в периферических тканях, таких как печень, заметно снижается, в то время как экспрессия в сердце остается сходной с экспрессией у AAV1. Эти различия предполагают, что другие структурные домены на капсиде AAVrh.10 могут иметь значение для придания трансдукции системного профиля. Что касается паренхимы головного мозга, важно отметить, что после входа в ЦНС профиль трансдукции AAV1RX после входа преимущественно является нейрональным с уменьшенной глиальной трансдукцией по сравнению с AAVrh.10. Вероятно, это можно объяснить тем фактом, что большая часть капсида происходит из AAV1, который, как известно, опосредует преимущественно нейронную трансдукцию после интрацеребровентрикулярных инъекций. Также возможно, что неизвестный механизм, с помощью которого 1RX преодолевает BBB, опосредует преимущественное поглощение нейронов или что дополнительные мотивы/аминокислотные остатки на капсиде AAVrh.10 могут опосредовать этапы после входа в глиальной трансдукции.

С клинической точки зрения капсиды, которые могут преодолевать BBB, преимущественно трансдуцируют нейроны в головном мозге и одновременно не нацелены на печень, могут демонстрировать улучшенный профиль безопасности для применения переноса генов, направленных на ЦНС, из системного пути введения. Снижение поглощения вектора в периферических органах, особенно в печени, может снизить потенциальную угрозу гепатотоксичности, о чем свидетельствует кратковременное повышение уровня трансаминаз в сыворотке пациента после системного введения определенных серотипов AAV.

Векторы AAV1R6/7/X можно широко использовать для глобального переноса генов ЦНС и, в частности, для разработки стратегий генной терапии для лечения

неврологических расстройств, таких как атаксия Фридрейха или атрофия мышц позвоночника. Таблица 1.

|                                   | GenBank<br>Регистрацион<br>ный номер |            | GenBank<br>Регистрацио<br>нный номер |      | GenBank<br>Регистрацион<br>ный номер |
|-----------------------------------|--------------------------------------|------------|--------------------------------------|------|--------------------------------------|
| Полные Геномы                     |                                      | Hu S17     | AY695376                             | Hu66 | AY530626                             |
| Аденоассоциирова<br>нный вирус 1  | NC_002077,<br>AF063497               | Hu T88     | AY695375                             | Hu42 | AY530605                             |
| Аденоассоциирова<br>нный вирус 2  | NC_001401                            | Hu T71     | AY695374                             | Hu67 | AY530627                             |
| Аденоассоциирова<br>нный вирус 3  | NC_001729                            | Hu T70     | AY695373                             | Hu40 | AY530603                             |
| Аденоассоциирова<br>нный вирус 3В | NC_001863                            | Hu T40     | AY695372                             | Hu41 | AY530604                             |
| Аденоассоциирова<br>нный вирус 4  | NC_001829                            | Hu T32     | AY695371                             | Hu37 | AY530600                             |
| Аденоассоциирова<br>нный вирус 5  | Y18065,<br>AF085716                  | Hu T17     | AY695370                             | Rh40 | AY530559                             |
| Аденоассоциирова<br>нный вирус 6  | NC_001862                            | Hu<br>LG15 | AY695377                             | Rh2  | AY243007                             |
| Птичий AAV<br>ATCC VR-865         | AY186198,<br>AY629583,<br>NC_004828  | Клад С     |                                      | Bb1  | AY243023                             |
| Птичий AAV<br>штамм DA-1          | NC_006263,<br>AY629583               | Hu9        | AY530629                             | Bb2  | AY243022                             |
| Бычий AAV                         | NC_005889,<br>AY388617,<br>AAR26465  | Hu10       | AY530576                             |      |                                      |
| AAV11                             | AAT46339,<br>AY631966                | Hu11       | AY530577                             | Rh10 | AY243015                             |
| AAV12                             | ABI16639,<br>DQ813647                |            |                                      | Hu17 | AY530582                             |
| Клад А                            |                                      | Hu53       | AY530615                             | Hu6  | AY530621                             |
| AAV1                              | NC_002077,<br>AF063497               | Hu55       | AY530617                             | Rh25 | AY530557                             |

|        |           |        |          |                          |                     |
|--------|-----------|--------|----------|--------------------------|---------------------|
| AAV6   | NC_001862 | Hu54   | AY530616 | Pi2                      | AY530554            |
| Hu,48  | AY530611  | Hu7    | AY530628 | Pi1                      | AY530553            |
| Hu 43  | AY530606  | Hu18   | AY530583 | Pi3                      | AY530555            |
| Hu 44  | AY530607  | Hu15   | AY530580 | Rh57                     | AY530569            |
| Hu 46  | AY530609  | Hu16   | AY530581 | Rh50                     | AY530563            |
| Клад В |           | Hu25   | AY530591 | Rh49                     | AY530562            |
| Hu. 19 | AY530584  | Hu60   | AY530622 | Hu39                     | AY530601            |
| Hu. 20 | AY530586  | Ch5    | AY243021 | Rh58                     | AY530570            |
| Hu 23  | AY530589  | Hu3    | AY530595 | Rh61                     | AY530572            |
| Hu22   | AY530588  | Hu1    | AY530575 | Rh52                     | AY530565            |
| Hu24   | AY530590  | Hu4    | AY530602 | Rh53                     | AY530566            |
| Hu21   | AY530587  | Hu2    | AY530585 | Rh51                     | AY530564            |
| Hu27   | AY530592  | Hu61   | AY530623 | Rh64                     | AY530574            |
| Hu28   | AY530593  | Клад D |          | Rh43                     | AY530560            |
| Hu 29  | AY530594  | Rh62   | AY530573 | AAV8                     | AF513852            |
| Hu63   | AY530624  | Rh48   | AY530561 | Rh8                      | AY242997            |
| Hu64   | AY530625  | Rh54   | AY530567 | Rh1                      | AY530556            |
| Hu13   | AY530578  | Rh55   | AY530568 | Клад F                   |                     |
| Hu56   | AY530618  | Cy2    | AY243020 | Hu14<br>(AAV9<br>)       | AY530579            |
| Hu57   | AY530619  | AAV7   | AF513851 | Hu31                     | AY530596            |
| Hu49   | AY530612  | Rh35   | AY243000 | Hu32                     | AY530597            |
| Hu58   | AY530620  | Rh37   | AY242998 | Клона<br>льный<br>изолят |                     |
| Hu34   | AY530598  | Rh36   | AY242999 | AAV5                     | Y18065,<br>AF085716 |
| Hu35   | AY530599  | Cy6    | AY243016 | AAV 3                    | NC_001729           |
| AAV2   | NC_001401 | Cy4    | AY243018 | AAV<br>3B                | NC_001863           |
| Hu45   | AY530608  | Cy3    | AY243019 | AAV4                     | NC_001829           |
| Hu47   | AY530610  | Cy5    | AY243017 | Rh34                     | AY243001            |
| Hu51   | AY530613  | Rh13   | AY243013 | Rh33                     | AY243002            |

|        |          |        |          |      |          |
|--------|----------|--------|----------|------|----------|
| Hu52   | AY530614 | Клад Е |          | Rh32 | AY243003 |
| Hu T41 | AY695378 | Rh38   | AY530558 |      |          |

ТАБЛИЦА 2. Модификации AAV1R7 в серотипах AAV 1, 2, 3, 6, 7, 8, 9 и rh10.

| Изменения Остатков AAV1R7 |       |       |       |       |       |       |          |
|---------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----------|
| AAV1                      | AAV2  | AAV3  | AAV6  | AAV7  | AAV8  | AAV9  | AAVrh.10 |
| Q148P                     | H148P | Q148P | Q148P | P148P | P148P | Q148P | P148P    |
| –                         | –151Q | –151Q | –     | –     | –     | –151Q | –        |
| E152R                     | V151R | Q152R | E152R | Q152R | R152R | Q152R | R152R    |
| –153S                     | E152S | E153S | –153S | S153S | S153S | E153S | S153S    |
| S157T                     | S158T | S158T | S157T | T158T | T158T | A158T | T158T    |
| T162K                     | A163K | S163K | T162K | K163K | K163K | S163K | K163K    |
| L188I                     | L189I | L189I | L188I | L189I | L189I | I189I | I189I    |
| S205A                     | T206A | S206A | S205A | A206A | A206A | S206A | A206A    |
| N223S                     | N224S | N224S | N223S | N224S | S224S | S224S | S224S    |
| A224S                     | S225S | S225S | A224S | A225S | S225S | S225S | S225S    |
| S262N                     | S263N | S263N | S262N | S263N | S263N | N263N | N263N    |
| A263G                     | Q264G | Q264G | A263G | E264G | G264G | S264G | G264G    |
| S264T                     | S265T | S265T | S264T | T265T | T265T | T265T | T265T    |
| T265S                     | –266S | G266S | T265S | A266S | T266S | S266S | S266S    |
| –267G                     | –267G | –267G | –267G | –267G | G267G | G267G | G267G    |
| –                         | –     | –268G | –     | –     | –     | –     | –        |
| A267S                     | A269S | A269S | A267S | S269S | A269S | S269S | S269S    |
| S268T                     | S270T | S270T | S268T | T270T | T270T | S270T | T270T    |
| H272T                     | H274T | H274T | H272T | T274T | T274T | A274T | T274T    |
| T326Q                     | Q328Q | Q328Q | T326Q | T328Q | Q328Q | D328Q | Q328Q    |
| D328E                     | D330E | D330E | D328E | D330E | E330E | N330E | E330E    |
| V330T                     | T332T | T332T | V330T | V332T | T332T | V332T | T332T    |
| T331K                     | T333K | T333K | T331K | T333K | K333K | K333K | K333K    |
| V341I                     | V343I | V343I | V341I | I343I | I343I | V343I | I343I    |
| S345T                     | T347T | T347T | S345T | S347T | T347T | T347T | T347T    |

\*Нумерация относительно дикого типа.

ТАБЛИЦА 3. Аминокислотные остатки и сокращения.

| Аминокислотный остаток | сокращение        |               |
|------------------------|-------------------|---------------|
|                        | Трехбуквенный код | Однобуквенный |

|                                  |     | код |
|----------------------------------|-----|-----|
| аланин                           | Ala | A   |
| Аргинин                          | Arg | R   |
| аспарагин                        | Asn | N   |
| аспарагиновая кислота (аспартат) | Asp | D   |
| цистеин                          | Cys | C   |
| глутамин                         | Gln | Q   |
| глутаминовая кислота (Глутамат)  | Glu | E   |
| глицин                           | Gly | G   |
| гистидин                         | His | H   |
| изолейцин                        | Ile | I   |
| лейцин                           | Leu | L   |
| Лизин                            | Lys | K   |
| метионин                         | Met | M   |
| фенилаланин                      | Phe | F   |
| пролин                           | Pro | P   |
| серин                            | Ser | S   |
| треонин                          | Thr | T   |
| триптофан                        | Trp | W   |
| Тирозин                          | Tyr | Y   |
| Valineвалин                      | Val | V   |

## ССЫЛКИ

Следующие ссылки полностью включены в настоящее описание посредством ссылки для всех целей.

1. Berns, K and Parrish, C (2007). Parvoviridae. Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE (ed), Fields Virol. 5th ed, vol II., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA: pp 2437–2477.

2. Gao, G, Vandenberghe, LH, Alvira, MR, Lu, Y, Calcedo, R, Zhou, X, et al. (2004). Clades of Adeno-associated viruses are widely disseminated in human tissues. J. Virol. 78: 6381–8.

3. Gao, G, Alvira, MR, Somanathan, S, Lu, Y, Vandenberghe, LH, Rux, JJ, et al. (2003). Adeno-associated viruses undergo substantial evolution in primates during natural infections. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 100: 6081–6086.

4. Agbandje-McKenna, M and Kleinschmidt, J (2011). AAV capsid structure and cell interactions. Methods Mol. Biol. 807: 47–92.

5. Madigan, VJ and Asokan, A (2016). Engineering AAV receptor footprints for gene

therapy. *Curr. Opin. Virol.* 18: 89–96.

6. Huang, LY, Halder, S and Agbandje-McKenna, M (2014). Parvovirus glycan interactions. *Curr. Opin. Virol.* 7C: 108–118.

7. Kashiwakura, Y, Tamayose, K, Iwabuchi, K, Hirai, Y, Shimada, T, Matsumoto, K, et al. (2005). Hepatocyte Growth Factor Receptor Is a Coreceptor for Adeno-Associated Virus Type 2 Infection. *J. Virol.* 79: 609–614.

8. Weller, ML, Amornphimoltham, P, Schmidt, M, Wilson, PA, Gutkind, JS and Chiorini, JA (2010). Epidermal growth factor receptor is a co-receptor for adeno-associated virus 26 serotype 6. *Nat. Med.* 16: 662–4.

9. Di Pasquale, G, Davidson, BL, Stein, CS, Martins, I, Scudiero, D, Monks, A, et al. (2003). Identification of PDGFR as a receptor for AAV-5 transduction. *Nat. Med.* 9: 1306–12.

10. Asokan, A, Hamra, JB, Govindasamy, L, Agbandje-McKenna, M and Samulski, RJ (2006). Adeno-associated virus type 2 contains an integrin  $\alpha 5 \beta 1$  binding domain essential for viral cell entry. *J. Virol.* 80: 8961–9.

11. Pillay, S, Meyer, NL, Puschnik, AS, Davulcu, O, Diep, J, Ishikawa, Y, et al. (2016). An essential receptor for adeno-associated virus infection. *Nature* 530: 108–112.

12. Murlidharan, G, Samulski, RJ and Asokan, A (2014). Biology of adeno-associated viral vectors in the central nervous system. *Front. Mol. Neurosci.* 7: 1–9.

13. Murlidharan, G, Crowther, A, Reardon, RA, Song, J and Asokan, A (2016). Glymphatic fluid transport controls paravascular clearance of AAV vectors from the brain. *JCI Insight* 1: 1–11.

14. Ballabh, P, Braun, A and Nedergaard, M (2004). The blood–brain barrier: An overview: Structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol. Dis.* 16: 1–13.

15. Williams, DW, Eugenin, EA, Calderon, TM and Berman, JW (2012). Monocyte maturation, HIV susceptibility, and transmigration across the blood brain barrier are critical in HIV neuropathogenesis. *J. Leukoc. Biol.* 91: 401–15.

16. Salinas, S, Schiavo, G and Kremer, EJ (2010). A hitchhiker's guide to the nervous system: the complex journey of viruses and toxins. *Nat. Rev. Microbiol.* 8: 645–655.

17. Yang, B, Li, S, Wang, H, Guo, Y, Gessler, DJ, Cao, C, et al. (2014). Global CNS transduction of adult mice by intravenously delivered rAAVrh.8 and rAAVrh.10 and nonhuman primates by rAAVrh.10. *Mol. Ther.* 22: 1299–1309.

18. Rosenberg, JB, Sondhi, D, Rubin, DG, Monette, S, Chen, A, Cram, S, et al. (2014). Comparative Efficacy and Safety of Multiple Routes of Direct CNS Administration of Adeno-Associated Virus Gene Transfer Vector Serotype rh.10 Expressing the Human Arylsulfatase A cDNA to Nonhuman Primates. *Hum. Gene Ther. Dev.* doi:10.1089/humc.2013.239 [doi].

19. Gray, SJ, Matagne, V, Bachaboina, L, Yadav, S, Ojeda, SR and Samulski, RJ (2011). Preclinical differences of intravascular AAV9 delivery to neurons and glia: a comparative study of adult mice and nonhuman primates. *Mol. Ther.* 19: 1058–1069.

20. Zhang, H, Yang, B, Mu, X, Ahmed, SS, Su, Q, He, R, et al. (2011). Several rAAV

vectors efficiently cross the blood–brain barrier and transduce neurons and astrocytes in the neonatal mouse central nervous system. *Mol. Ther.* 19: 1440–1448.

21. Cearley, CN, Vandenberghe, LH, Parente, MK, Carnish, ER, Wilson, JM and Wolfe, JH (2008). Expanded repertoire of AAV vector serotypes mediate unique patterns of transduction in mouse brain. *Mol. Ther.* 16: 1710–8.

22. Grieger, JC, Snowdy, S and Samulski, RJ (2006). Separate Basic Region Motifs within the Adeno–Associated Virus Capsid Proteins Are Essential for Infectivity and Assembly. *J. Virol.* 80: 5199–5210.

23. Sonntag, F, Bleker, S, Leuchs, B, Fischer, R and Kleinschmidt, JA (2006). Adeno–associated virus type 2 capsids with externalized VP1/VP2 trafficking domains are generated prior to passage through the cytoplasm and are maintained until uncoating occurs in the nucleus. *J. Virol.* 80: 11040–11054.

24. Bowles, DE, McPhee, SW, Li, C, Gray, SJ, Samulski, JJ, Camp, AS, et al. (2012). Phase 1 gene therapy for Duchenne muscular dystrophy using a translational optimized AAV vector. *Mol. Ther.* 20: 443–455.

25. Li, C, Diprimio, N, Bowles, DE, Hirsch, ML, Monahan, PE, Asokan, A, et al. (2012). Single amino acid modification of adeno–associated virus capsid changes transduction and humoral immune profiles. *J. Virol.* 86: 7752–7759.

26. Bleker, S, Sonntag, F and Kleinschmidt, JA (2005). Mutational analysis of narrow pores at the fivefold symmetry axes of adeno–associated virus type 2 capsids reveals a dual role in genome packaging and activation of phospholipase A2 activity. *J. Virol.* 79: 2528–2540.

27. Wu, Z, Miller, E, Agbandje–McKenna, M and Samulski, RJ (2006). Alpha2,3 and alpha2,6 N-linked sialic acids facilitate efficient binding and transduction by adeno–associated virus types 1 and 6. *J. Virol.* 80: 9093–103.

28. Huang, L–Y, Patel, A, Ng, R, Miller, EB, Halder, S, McKenna, R, et al. Characterization of the Adeno–Associated Virus 1 and 6 Sialic Acid Binding Site doi:10.1128/JVI.00161–16.

29. Bell, CL, Gurda, BL, Vliet, K Van, Agbandje–McKenna, M and Wilson, JM (2012). Identification of the galactose binding domain of the AAV9 capsid. *J. Virol.* 86: 7326–7333.

30. Rosenberg, JB, Sondhi, D, Rubin, DG, Monette, S, Chen, A, Cram, S, et al. (2014). Comparative efficacy and safety of multiple routes of direct CNS administration of adeno–associated virus gene transfer vector serotype rh.10 expressing the human arylsulfatase A cDNA to nonhuman primates. *Hum. Gene Ther. Clin. Dev.* 25: 164–77.

31. Cearley, CN and Wolfe, JH (2006). Transduction characteristics of adeno–associated virus vectors expressing cap serotypes 7, 8, 9, and Rh10 in the mouse brain. *Mol. Ther.* 13: 528–37.

32. Hadaczek, P, Forsayeth, J, Mirek, H, Munson, K, Bringas, J, Pivrotto, P, et al. (2009). Transduction of nonhuman primate brain with adeno–associated virus serotype 1: vector trafficking and immune response. *Hum. Gene Ther.* 20: 225–237.



33. Chen, S, Kapturczak, M, Loiler, SA, Zolotukhin, S, Glushakova, OY, Madsen, KM, et al. (2005). Efficient Transduction of Vascular Endothelial Cells with Recombinant Adeno-Associated Virus Serotype 1 and 5 Vectors. *Hum. Gene Ther.* 16: 235–247.
34. Pulicherla, N, Shen, S, Yadav, S, Debbink, K, Govindasamy, L, Agbandje-McKenna, M, et al. (2011). Engineering Liver-detargeted AAV9 Vectors for Cardiac and Musculoskeletal Gene Transfer. *Mol. Ther.* 19: 1070–1078.
35. Asokan, A, Conway, JC, Phillips, JL, Li, C, Hegge, J, Sinnott, R, et al. (2010). Reengineering a receptor footprint of adeno-associated virus enables selective and systemic gene transfer to muscle. *Nat. Biotechnol.* 28: 79–82.
36. Nathwani, AC, Reiss, UM, Tuddenham, EGD, Rosales, C, Chowdary, P, McIntosh, J, et al. (2014). Long-term safety and efficacy of factor IX gene therapy in hemophilia B. *N. Engl. J. Med.* 371: 1994–2004.
37. Mingozzi, F and High, KA (2013). Immune responses to AAV vectors: overcoming barriers to successful gene therapy. *Blood* 122: 23–36.
38. Kumar, S, Stecher, G and Tamura, K (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33: 1870–4.
39. Saitou, N and Nei, M (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406–25.
40. Felsenstein, J (1985). CONFIDENCE LIMITS ON PHYLOGENIES: AN APPROACH USING THE BOOTSTRAP. *Evolution* (NY). 39: 783–791.
41. Murlidharan, G, Sakamoto, K, Rao, L, Corriher, T, Wang, D, Gao, G, et al. (2016). CNS-restricted Transduction and CRISPR/Cas9-mediated Gene Deletion with an Engineered AAV Vector. *Mol. Ther. – Nucleic Acids* 5: e338.
42. Lein, ES, Hawrylycz, MJ, Ao, N, Ayres, M, Bensinger, A, Bernard, A, et al. (2007). Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature* 445: 168–176.
43. Miller, EB, Gurda-Whitaker, B, Govindasamy, L, McKenna, R, Zolotukhin, S, Muzyczka N, et al. (2006). Production, purification and preliminary X-ray crystallographic studies of adeno-associated virus serotype 1. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 62: 1271–1274.
44. Bordoli, L, Kiefer, F, Arnold, K, Benkert, P, Battey, J and Schwede, T (2008). Protein structure homology modeling using SWISS-MODEL workspace. *Nat. Protoc.* 4: 1–13.
45. Nam, HJ, Lane, MD, Padron, E, Gurda, B, McKenna, R, Kohlbrenner, E, et al. (2007). Structure of adeno-associated virus serotype 8, a gene therapy vector. *J. Virol.* 81: 12260–12271.
46. Krissinel, E and Henrick, K (2004). Secondary-structure matching (SSM), a new tool for fast protein structure alignment in three dimensions. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 60: 2256–2268.
47. Emsley, P, Lohkamp, B, Scott, WG and Cowtan, K (2010). Features and development of Coot. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 66: 486–501.

48. Carrillo–Tripp, M, Shepherd, CM, Borelli, IA, Venkataraman, S, Lander, G, Natarajan, P, et al. (2009). VIPERdb2: an enhanced and web API enabled relational database for structural virology. *Nucleic Acids Res.* 37: D436–42.
49. Xiao, C and Rossmann, MG (2007). Interpretation of electron density with stereographic roadmap projections. *J. Struct. Biol.* 158: 182–187.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Капсидный белок аденоассоциированного вируса (AAV), причем капсидный белок AAV содержит модификацию в аминокислотных остатках S262, A263, S264, T265, A267, S268 и H272 и одну вставку аминокислотного остатка между остатками G266 и A267, (нумерация VP1), причем нумерация каждого остатка основана на аминокислотной последовательности AAV1 (SEQ ID NO:1) или эквивалентном аминокислотном остатке в AAV2 (SEQ ID NO:2), AAV3 (SEQ ID NO:3), AAV6 (SEQ ID NO:4), AAV7 (SEQ ID NO:5), AAV8 (SEQ ID NO:6), AAV9 (SEQ ID NO:7) или AAVrh10 (SEQ ID NO:8).

2. Капсидный белок AAV по п.1, дополнительно содержащий модификацию в аминокислотных остатках Q148, E152, S157, T162, T326, D328, V330, T331, V341 и S345 и одну вставку аминокислотного остатка между остатками E152 и P153 (нумерация VP1), причем нумерация каждого остатка основана на аминокислотной последовательности SEQ ID NO:1 или эквивалентном аминокислотном остатке в SEQ ID NO:2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8.

3. Капсидный белок AAV по п.2, дополнительно содержащий модификацию аминокислотных остатков L188, S205, N223 и A224 (нумерация VP1), причем нумерация каждого остатка основана на аминокислотной последовательности SEQ ID NO:1 или эквивалентном аминокислотном остатке в SEQ ID NO:2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8.

4. Капсидный белок AAV по любому из пп. 1–3, в котором модификация представляет собой по меньшей мере одну из S262N, A263G, S264T, T265S, A267S, S268T и H272T.

5. Капсид AAV по любому из пп. 1–2, в котором модификация представляет собой по меньшей мере одну из Q148P, E152R, S157T, T162K, T326Q, D328E, V330T, T331K, V341I и S345T.

6. Капсид AAV по п.3, в котором модификация представляет собой по меньшей мере одну из L188I, S205A, N223S и A224S.

7. Капсидный белок AAV по п.1, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из общей группы, состоящей из:

- a) аминокислотной последовательности SEQ ID NO:9 (AAV1RX);
- b) аминокислотной последовательности SEQ ID NO:10 (AAV2RX);
- c) аминокислотной последовательности SEQ ID NO:11 (AAV3RX);
- d) аминокислотной последовательности SEQ ID NO:12 (AAV6RX);
- e) аминокислотной последовательности SEQ ID NO:13 (AAV7RX);
- f) аминокислотной последовательности SEQ ID NO:14 (AAV8RX); и
- g) аминокислотной последовательности SEQ ID NO:15 (AAV9RX).

8. Капсид AAV по п.2, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из общей группы, состоящей из:

- a) аминокислотной последовательности SEQ ID NO:16 (AAV1R6);
- b) аминокислотной последовательности SEQ ID NO:17 (AAV2R6);
- c) аминокислотной последовательности SEQ ID NO:18 (AAV3R6);
- d) аминокислотной последовательности SEQ ID NO:19 (AAV6R6);

- e) аминокислотной последовательности SEQ ID NO:20 (AAV7R6);
- f) аминокислотной последовательности SEQ ID NO:21 (AAV8R6); и
- g) аминокислотной последовательности SEQ ID NO:22 (AAV9R6).

9. Капсид AAV по п.3, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из общей группы, состоящей из:

- a) аминокислотной последовательности SEQ ID NO:23 (AAV1R7);
- b) аминокислотной последовательности SEQ ID NO:24 (AAV2R7);
- c) аминокислотной последовательности SEQ ID NO:25 (AAV3R7);
- d) аминокислотной последовательности SEQ ID NO:26 (AAV6R7);
- e) аминокислотной последовательности SEQ ID NO:27 (AAV7R7);
- f) аминокислотной последовательности SEQ ID NO:28 (AAV8R7); и
- g) аминокислотной последовательности SEQ ID NO:29 (AAV9R7).

10. Капсид AAV, содержащий капсидный белок по любому из пп. 1–9.

11. Вирусный вектор, содержащий:

(a) капсид AAV по п.10; и

(b) нуклеиновую кислоту, содержащую по меньшей мере одну концевую повторяющуюся последовательность,

причем нуклеиновая кислота заключена в капсид AAV.

12. Композиция, содержащая вирусный вектор по п.11 в фармацевтически приемлемом носителе.

13. Способ введения в клетку молекулы нуклеиновой кислоты, включающий введение клетки в контакт с вирусным вектором по п.11 и/или композицией по п.12.

14. Способ доставки пациенту молекулы нуклеиновой кислоты, включающий введение пациенту вирусного вектора по п.11 и/или композиции по п.12.

15. Способ по п.14, в котором вирусный вектор и/или композицию вводят в центральную нервную систему пациента.

16. Способ по п.15, в котором вирусный вектор и/или композицию доставляют через гематоэнцефалический барьер.

17. Способ по любому из пп. 14, 15 или 16, в котором вирусный вектор содержит интересующую молекулу нуклеиновой кислоты.

18. Способ выборочной доставки интересующей молекулы нуклеиновой кислоты в нейронную клетку, включающий введение нейронной клетки в контакт с вирусным вектором по п.11, причем вирусный вектор содержит интересующую молекулу нуклеиновой кислоты.

19. Способ по п.18, дополнительно включающий выборочную доставку интересующей молекулы нуклеиновой кислоты в кардиомиоцит.

20. Способ по любому из пп. 17, 18 или 19, в котором интересующая молекула нуклеиновой кислоты кодирует терапевтический белок или терапевтическую РНК.

21. Способ по любому из пп. 18, 19 или 20, в котором нейронная клетка и кардиомиоцит находится у пациента.

22. Способ по п.21, в котором вирусный вектор не нацелен на спленоциты, гепатоциты или клетки почки.

23. Способ по любому из пп. 14–17, 21 или 22, в котором пациент представляет собой пациента–человека.

24. Способ лечения неврологического расстройства или нарушения у пациента, включающий введение пациенту вирусного вектора по п.11, причем вирусный вектор содержит молекулу нуклеиновой кислоты, которая кодирует терапевтический белок или терапевтическую РНК, эффективную при лечении неврологического расстройства или нарушения.

25. Способ лечения неврологического и сердечно–сосудистого расстройства или нарушения у пациента, включающий введение пациенту вирусного вектора по п.11, причем вирусный вектор содержит молекулу нуклеиновой кислоты, которая кодирует терапевтический белок или терапевтическую РНК, эффективную при лечении неврологического и кардиологического расстройства или нарушения.

26. Способ по любому из пп. 14–17, 21, 22, 23, 24 или 25, в котором вирусный вектор или композицию вводят пациенту внутривенно, внутриапериартериально или внутрибрюшинно.

27. Способ по любому из пп. 14–17, 21, 22, 23, 24 или 25, в котором вирусный вектор или композицию вводят пациенту посредством интрацеребровентрикулярного, интракостального, интрапаренхиматозного, внутримозгового и/или внутрибрюшного пути введения.

28. Способ по любому из пп. 24–27, в котором введение вирусного вектора и/или композиции пациенту системно приводит к понижению трансдукции в нежелательных мишенях тканей.

29. Капсидный белок аденоассоциированного вируса (AAV), причем капсидный белок AAV содержит модификацию в аминокислотных остатках S262, A263, S264, T265 и A267 (нумерация VP1) и одну вставку аминокислотного остатка между остатками S268 и N269, причем аминокислотные остатки основаны на аминокислотной последовательности AAV1 (SEQ ID NO:1) или эквивалентных аминокислотных остатках в AAV2 (SEQ ID NO:2), AAV3 (SEQ ID NO:3), AAV6 (SEQ ID NO:4), AAV7 (SEQ ID NO:5), AAV8 (SEQ ID NO:6), AAV9 (SEQ ID NO:7) или AAVrh10 (SEQ ID NO:8).

30. Капсидный белок AAV по п.29, причем капсидный белок дополнительно содержит модификацию в аминокислотном остатке H272.

31. Капсидный белок AAV по п.29 или п.30, причем капсидный белок AAV дополнительно содержит модификацию в аминокислотных остатках Q148, E152, S157, T162, H272, T326, D328, V330, T331, V341 и S345 и одну вставку аминокислотного остатка между остатками E152 и P153.

32. Капсидный белок AAV по любому из пп. 29–31, причем капсидный белок AAV дополнительно содержит модификацию в аминокислотных остатках L188, S205, N223, A224, и H272.

33. Капсидный белок AAV по любому из пп. 29–32, в котором модификация представляет собой по меньшей мере одну из S262N, A263G, S264T, T265S, и A267S.

34. Капсидный белок AAV по любому из пп. 31–33, в котором модификация представляет собой по меньшей мере одну из Q148P, E152R, S157T, T162K, H272T, T326Q, D328E, V330T, T331K, V341I и S345T.

35. Капсидный белок AAV по любому из пп. 32–24, в котором модификация представляет собой по меньшей мере одну из L188I, S205A, N223S, A224S и H272T.

36. Капсидный белок AAV по любому из пп. 29–35, в котором вставкой аминокислотного остатка между остатками S268 и N269 является вставка одного T остатка.

37. Капсидный белок AAV по любому из пп. 31–36, в котором вставкой аминокислотного остатка между остатками E152 и P153 является вставка одного S остатка.

38. Капсидный белок AAV по п.29, в котором аминокислотная последовательность капсидного белка выбрана из группы, состоящей из:

- a) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9 (AAV1RX);
- b) аминокислотной последовательности SEQ ID NO:10 (AAV2RX);
- c) аминокислотной последовательности SEQ ID NO:11 (AAV3RX);
- d) аминокислотной последовательности SEQ ID NO:12 (AAV6RX);
- e) аминокислотной последовательности SEQ ID NO:13 (AAV7RX);
- f) аминокислотной последовательности SEQ ID NO:14 (AAV8RX); и
- g) аминокислотной последовательности SEQ ID NO:15 (AAV9RX).

39. Капсидный белок AAV по п.38, в котором аминокислотной последовательностью капсидного белка является SEQ ID NO:9 (AAV1RX).

40. Капсидный белок AAV по п.31, в котором аминокислотная последовательность капсидного белка выбрана из группы, состоящей из:

- a) аминокислотной последовательности SEQ ID NO:16 (AAV1R6);
- b) аминокислотной последовательности SEQ ID NO:17 (AAV2R6);
- c) аминокислотной последовательности SEQ ID NO:18 (AAV3R6);
- d) аминокислотной последовательности SEQ ID NO:19 (AAV6R6);
- e) аминокислотной последовательности SEQ ID NO:20 (AAV7R6);
- f) аминокислотной последовательности SEQ ID NO:21 (AAV8R6); и
- g) аминокислотной последовательности SEQ ID NO:22 (AAV9R6).

41. Капсидный белок AAV по п.40, в котором аминокислотной последовательностью капсидного белка является SEQ ID NO:16 (AAV1R6).

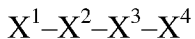
42. Капсидный белок AAV по п.32, в котором аминокислотная последовательность капсидного белка выбрана из группы, состоящей из:

- a) аминокислотной последовательности SEQ ID NO:23 (AAV1R7);
- b) аминокислотной последовательности SEQ ID NO:24 (AAV2R7);
- c) аминокислотной последовательности SEQ ID NO:25 (AAV3R7);

- d) аминокислотной последовательности SEQ ID NO:26 (AAV6R7);
- e) аминокислотной последовательности SEQ ID NO:27 (AAV7R7);
- f) аминокислотной последовательности SEQ ID NO:28 (AAV8R7); и
- g) аминокислотной последовательности SEQ ID NO:29 (AAV9R7).

43. Капсидный белок AAV по п.42, в котором аминокислотной последовательностью капсидного белка является SEQ ID NO:23 (AAV1R7).

44. Капсидный белок аденоассоциированного вируса (AAV), причем капсидный белок AAV содержит модификацию, которая приводит к аминокислотной последовательности:



в аминокислотах, соответствующих положениям аминокислот 262–265 (нумерация VP1) нативного AAV1 капсидного белка (SEQ ID NO: 1),

- причем  $X^1$  представляет собой любую аминокислоту, не являющуюся S;
- причем  $X^2$  представляет собой любую аминокислоту, не являющуюся A;
- причем  $X^3$  представляет собой любую аминокислоту, не являющуюся S; и
- причем  $X^4$  представляет собой любую аминокислоту, не являющуюся T.

45. Капсидный белок AAV по п.44, в котором аминокислотой  $X^1$  является N.

46. Капсидный белок AAV по п.44, в котором аминокислотой  $X^2$  является G.

47. Капсидный белок AAV по п.44, в котором аминокислотой  $X^3$  является T.

48. Капсидный белок AAV по п.44, в котором аминокислотой  $X^4$  является S.

49. Капсидный белок AAV по п.44, в котором аминокислотой  $X^1$  является N,  $X^2$  является G,  $X^3$  является T, а  $X^4$  является S.

50. Капсидный белок AAV по любому из пп. 44–49, в котором капсидный белок дополнительно содержит модификацию в аминокислотном остатке H272.

51. Капсидный белок AAV по п.50, в котором модификацией является H272T.

52. Капсидный белок AAV по любому из пп. 44–51, в котором капсидный белок AAV дополнительно содержит вставку аминокислотного остатка между аминокислотными остатками S268 и N269.

53. Капсидный белок AAV по п.52, в котором вставкой аминокислотного остатка является вставка одного T остатка.

54. Аденоассоциированный вирусный (AAV) вектор, содержащий капсидный белок AAV по любому из пп. 29–53.

55. AAV вектор по п.54, дополнительно содержащий:

нуклеиновую кислоту, содержащую по меньшей мере одну концевую повторяющуюся последовательность, причем нуклеиновая кислота заключена в капсидный белок AAV.

56. AAV вирусный вектор по п.55, в котором концевой повторяющейся последовательностью является концевой повтор AAV.

57. AAV вирусный вектор по п.55, в котором концевой повторяющейся последовательностью является концевой повтор не AAV.

58. AAV вирусный вектор по любому из пп. 55–57, в котором нуклеиновая кислота дополнительно содержит последовательность, кодирующую терапевтический белок или терапевтическую РНК.

59. Фармацевтическая композиция, содержащая вирусный вектор по любому из пп. 54–58.

60. Фармацевтическая композиция по п.59, причем композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель.

61. Способ введения в клетку молекулы нуклеиновой кислоты, включающий введение клетки в контакт с AAV вирусным вектором по любому из пп. 54–59.

62. Способ введения в клетку молекулы нуклеиновой кислоты, включающий введение клетки в контакт с фармацевтической композицией по п.59 или 60.

63. Способ по п.61 или 62, в котором вирусный вектор или композицию вводят в центральную нервную систему пациента.

64. Способ по п.63, в котором вирусный вектор или композицию доставляют через гематоэнцефалический барьер.

65. Способ по п.61 или 62, в котором вирусный вектор или композиция не нацелены на печень.

66. Способ по п.61 или 62, в котором вирусный вектор или композиция не нацелены на почки.

67. Способ по п.61 или 62, в котором вирусный вектор или композиция не нацелены на селезенку.

68. Способ выборочной доставки терапевтического белка или терапевтической РНК в нейронную клетку у пациента, включающий введение нейронной клетки в контакт с вирусным вектором по любому из пп. 54–58 или композицией по пп. 59–60, причем вирусный вектор или композиция содержит терапевтический белок или терапевтическую РНК.

69. Способ по п.68, в котором вирусный вектор или композиция не нацелены на печень.

70. Способ по пп. 68, в котором вирусный вектор или композиция не нацелены на почки.

71. Способ по п.68, в котором вирусный вектор или композиция не нацелены на селезенку.

72. Способ лечения неврологического расстройства или нарушения у пациента, включающий введение пациенту вирусного вектора по любому из пп. 54–58 или композиции по пп. 59–60, причем вирусный вектор или композиция содержит молекулу нуклеиновой кислоты, которая кодирует терапевтический белок или терапевтическую РНК, эффективную при лечении неврологического расстройства.

73. Способ по п.72, дополнительно включающий лечение сердечно-сосудистого расстройства или нарушения у пациента.

74. Способ по п.72, в котором вирусный вектор или композицию выборочно



доставляют в нейронную клетку.

75. Способ по п.72, в котором вирусный вектор или композицию выборочно доставляют в кардиомиоцит.

76. Способ по п.72, в котором вирусный вектор или композиция не нацелены на печень, почки и/или селезенку.

77. Способ по любому из пп. 61–76, в котором пациент представляет собой млекопитающее.

78. Способ по любому из пп. 61–77, в котором пациентом является человек.

79. Способ по любому из пп. 61–78, в котором вирусный вектор или композицию доставляют пациенту посредством пути введения, выбранного из группы, состоящей из внутривенного, внутриартериального, внутрибрюшинного, интрацеребровентрикулярного, интрацистерального, интрапаренхимального, внутричерепного и внутриоболочечного.

80. Способ по п.79, в котором вирусный вектор или композицию доставляют пациенту посредством внутривенного введения.

81. Капсидный белок аденоассоциированного вируса (AAV), причем капсидный белок AAV содержит модификацию в аминокислотных остатках S262, A263, S264, T265, A267, и H272 и одну вставку аминокислотного остатка между остатками S268 и N269, (нумерация VP1), причем нумерация каждого остатка основана на аминокислотной последовательности AAV1 (SEQ ID NO:2) или эквивалентном аминокислотном остатке в AAV1 (SEQ ID NO:1), AAV3 (SEQ ID NO:3), AAV6 (SEQ ID NO:4), AAV7 (SEQ ID NO:5), AAV8 (SEQ ID NO:6), AAV9 (SEQ ID NO:7) или AAVrh10 (SEQ ID NO:8).

82. Капсидный белок AAV по п.81, в котором модификация содержит по меньшей мере одну из S262N, A263G, S264T, T265S, A267G и H272T.

83. Капсидный белок AAV по пп. 81 или 82, в котором одной вставкой аминокислотного остатка между остатками S268 и N269 является вставка одного T остатка.

84. Капсидный белок AAV по любому из пп. 81–83, в котором капсидный белок AAV содержит последовательность SEQ ID NO: 30 или SEQ ID NO 33.

85. Капсидный белок аденоассоциированного вируса (AAV), причем капсидный белок AAV содержит модификацию в аминокислотных остатках S262, Q263, S264, A266, S267 и H271 и вставку по меньшей мере одного аминокислотного остатка между остатками S261 и S262, (нумерация VP1), причем нумерация каждого остатка основана на аминокислотной последовательности AAV2 (SEQ ID NO:2) или эквивалентном аминокислотном остатке в AAV1 (SEQ ID NO:1), AAV3 (SEQ ID NO:3), AAV6 (SEQ ID NO:4), AAV7 (SEQ ID NO:5), AAV8 (SEQ ID NO:6), AAV9 (SEQ ID NO:7) или AAVrh10 (SEQ ID NO:8).

86. Капсидный белок AAV по п.85, в котором модификация содержит по меньшей мере одну из S262T, Q263S, S264G, A266S, S267T и H271T.

87. Капсидный белок AAV по пп. 85 или 86, в котором вставкой между остатками

SS61 и S262 является вставка одного аминокислотного остатка.

88. Капсидный белок AAV по пп. 85 или 86, в котором вставкой между остатками S251 и S252 является вставка более чем одного аминокислотного остатка.

89. Капсидный белок AAV по п.88, в котором вставкой между остатками S251 и S252 является вставка остатка N и G.

90. Капсидный белок AAV по любому из пп. 85–89, в котором капсидный белок AAV содержит последовательность SEQ ID NO: 31.

91. Капсидный белок аденоассоциированного вируса (AAV), причем капсидный белок AAV содержит модификацию в аминокислотных остатках S262, Q263, S264, A266, A267, H271 и одну вставку аминокислотного остатка между остатками S261 и S262, причем нумерация каждого остатка основана на аминокислотной последовательности AAV3 (SEQ ID NO:3) или эквивалентном аминокислотном остатке в AAV1 (SEQ ID NO:1), AAV2 (SEQ ID NO:2), AAV6 (SEQ ID NO:4), AAV7 (SEQ ID NO:5), AAV8 (SEQ ID NO:6), AAV9 (SEQ ID NO:7) или AAVrh10 (SEQ ID NO:8).

92. Капсидный белок AAV по п.91, в котором модификация содержит по меньшей мере один из S262T, Q263S, S264G, A266S, A267T, H271T.

93. Капсидный белок AAV по пп. 91 или 92, в котором вставкой между остатками SS61 и S262 является вставка одного аминокислотного остатка.

94. Капсидный белок AAV по пп. 91 или 92, в котором вставкой между остатками S251 и S252 является вставка более чем одного аминокислотного остатка.

95. Капсидный белок AAV по п.94, в котором вставкой между остатками S251 и S252 является вставка остатка N и G.

96. Капсидный белок AAV по любому из пп. 91–95, в котором капсидный белок AAV содержит последовательность SEQ ID NO: 32.

97. Капсидный белок аденоассоциированного вируса (AAV), причем капсидный белок AAV содержит модификацию в аминокислотных остатках S263, S269, A237 (нумерация VP1), причем нумерация каждого остатка основана на аминокислотной последовательности AAV9 (SEQ ID NO:9) или эквивалентном аминокислотном остатке в AAV1 (SEQ ID NO: 1), AAV2 (SEQ ID NO:2), AAV3 (SEQ ID NO:3), AAV6 (SEQ ID NO:4), AAV7 (SEQ ID NO:5), AAV8 (SEQ ID NO:6) или AAVrh10 (SEQ ID NO:8).

98. Капсидный белок AAV по п.97, в котором модификация содержит по меньшей мере один из S263G, S269T и A237T.

99. Капсидный белок AAV по п.97 или 98, в котором капсидный белок AAV содержит последовательность SEQ ID NO: 34.

100. Капсидный белок аденоассоциированного вируса (AAV), причем капсидный белок AAV содержит последовательность согласно любой одной из SEQ ID NO: 9–SEQ ID NO: 34.

101. Аденоассоциированный вирусный (AAV) вектор, содержащий капсидный белок AAV по любому из пп. 81–100.

102. AAV вектор по п.101, дополнительно содержащий:

нуклеиновую кислоту, содержащую по меньшей мере одну концевую повторяющуюся последовательность, причем нуклеиновая кислота заключена в капсидный белок AAV.

103. AAV вирусный вектор по п.102, в котором концевой повторяющейся последовательностью является концевой повтор AAV.

104. AAV вирусный вектор по п.102, в котором концевой повторяющейся последовательностью является концевой повтор не AAV.

105. AAV вирусный вектор по любому из пп. 101–104, в котором нуклеиновая кислота дополнительно содержит последовательность, кодирующую терапевтический белок или терапевтическую РНК.

106. Фармацевтическая композиция, содержащая вирусный вектор по любому из пп. 101–105.

107. Фармацевтическая композиция по п.106, причем композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель.

108. Способ введения в клетку молекулы нуклеиновой кислоты, включающий введение клетки в контакт с AAV вирусным вектором по любому из пп. 101–105.

109. Способ введения в клетку молекулы нуклеиновой кислоты, включающий введение клетки в контакт с фармацевтической композицией по п.106 или 107.

110. Способ по п.108 или 109, в котором вирусный вектор или композицию вводят в центральную нервную систему пациента.

111. Способ по п.110, в котором вирусный вектор или композицию доставляют через гематоэнцефалический барьер.

112. Способ по п.108 или 109, в котором вирусный вектор или композиция не нацелены на печень.

113. Способ по п.108 или 109, в котором вирусный вектор или композиция не нацелены на почки.

114. Способ по п.108 или 109, в котором вирусный вектор или композиция не нацелены на селезенку.

115. Способ выборочной доставки терапевтического белка или терапевтической РНК в нейронную клетку у пациента, включающий введение нейронной клетки в контакт с вирусным вектором по любому из пп. 101–105 или композицией по пп. 106–107, причем вирусный вектор или композиция содержит терапевтический белок или терапевтическую РНК.

116. Способ по п.115, в котором вирусный вектор или композиция не нацелены на печень.

117. Способ по пп. 115, в котором вирусный вектор или композиция не нацелены на почки.

118. Способ по п.115, в котором вирусный вектор или композиция не нацелены на селезенку.

119. Способ лечения неврологического расстройства или нарушения у пациента,

включающий введение пациенту вирусного вектора по любому из пп. 101–105 или композиции по пп. 106–107, причем вирусный вектор или композиция содержит молекулу нуклеиновой кислоты, которая кодирует терапевтический белок или терапевтическую РНК, эффективную при лечении неврологического расстройства.

120. Способ по п.119, дополнительно включающий лечение сердечно–сосудистого расстройства или нарушения у пациента.

121. Способ по п.119, в котором вирусный вектор или композицию выборочно доставляют в нейронную клетку.

122. Способ по п.119, в котором вирусный вектор или композицию выборочно доставляют в кардиомиоцит.

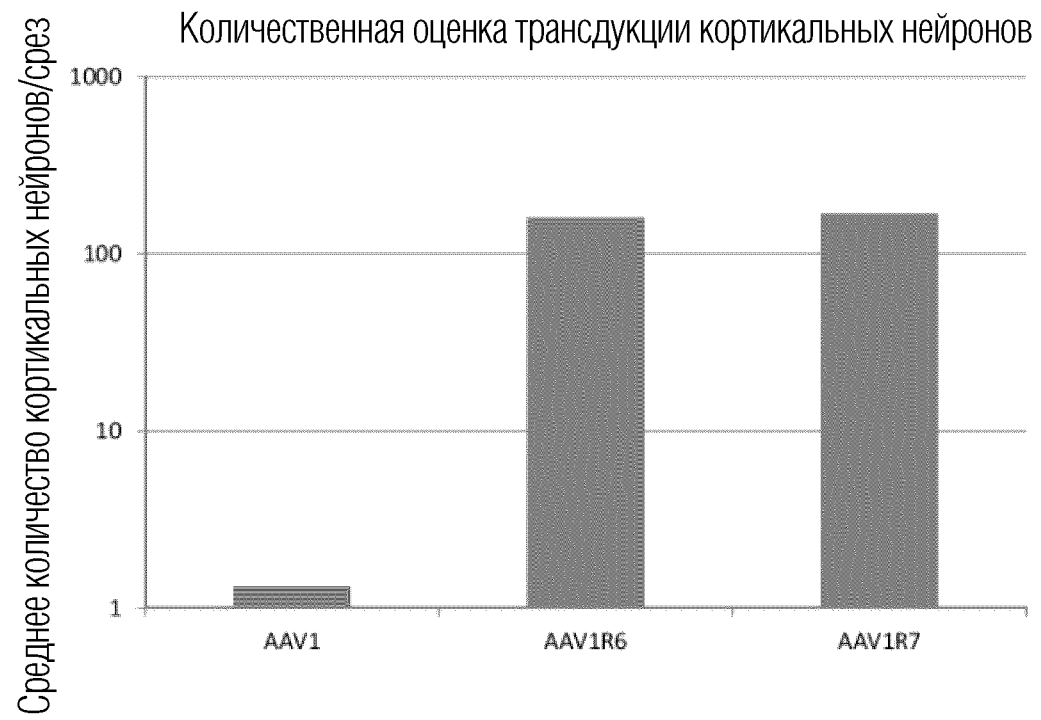
123. Способ по п.119, в котором вирусный вектор или композиция не нацелены на печень, почки и/или селезенку.

124. Способ по любому из пп. 108–123, в котором пациент представляет собой млекопитающее.

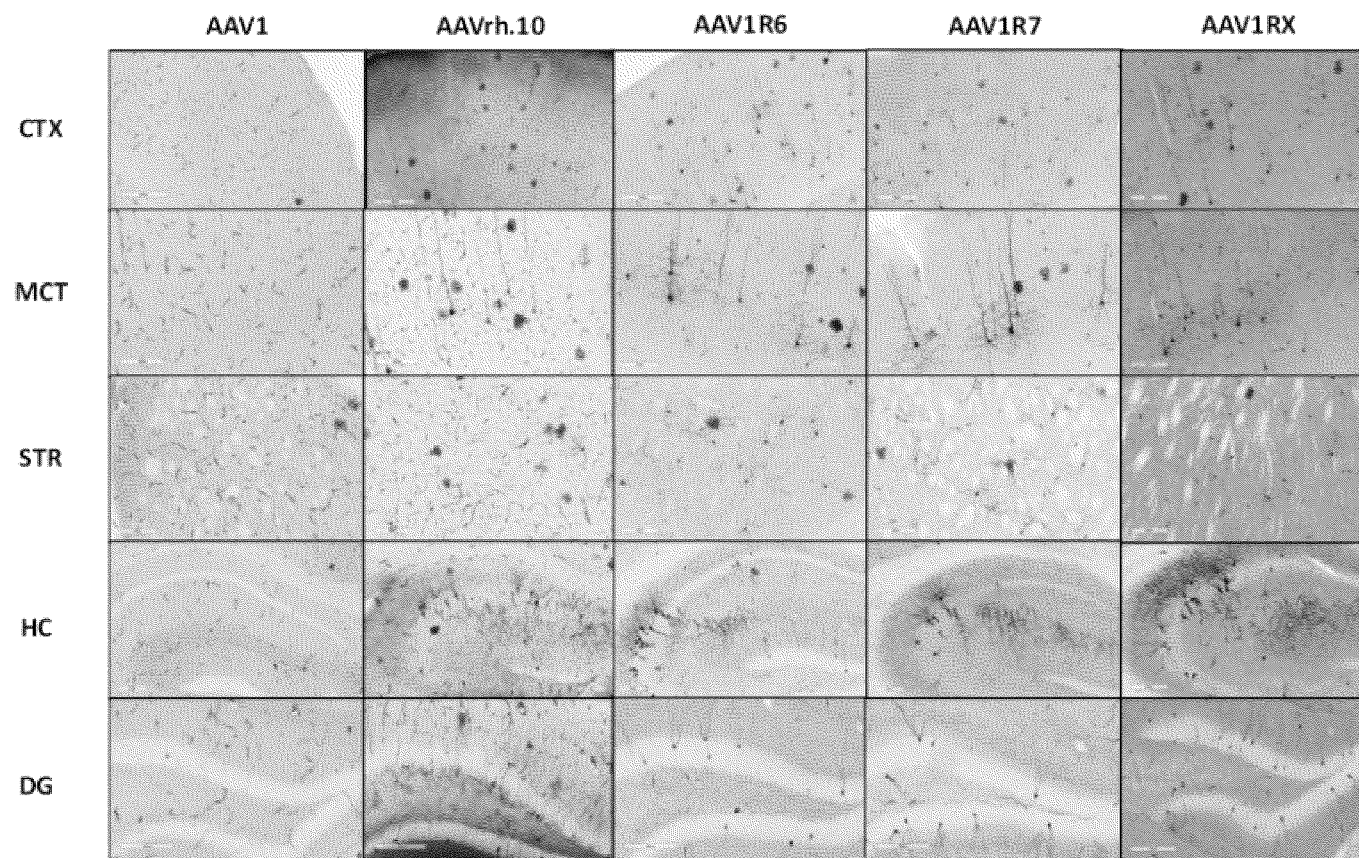
125. Способ по любому из пп. 108–124, в котором пациентом является человек.

126. Способ по любому из пп. 108–125, в котором вирусный вектор или композицию доставляют пациенту посредством пути введения, выбранного из группы, состоящей из внутривенного, внутриартериального, внутрибрюшинного, интрацеребровентрикулярного, интракостерального, интрапаренхимального, внутричерепного и внутриоболочечного.

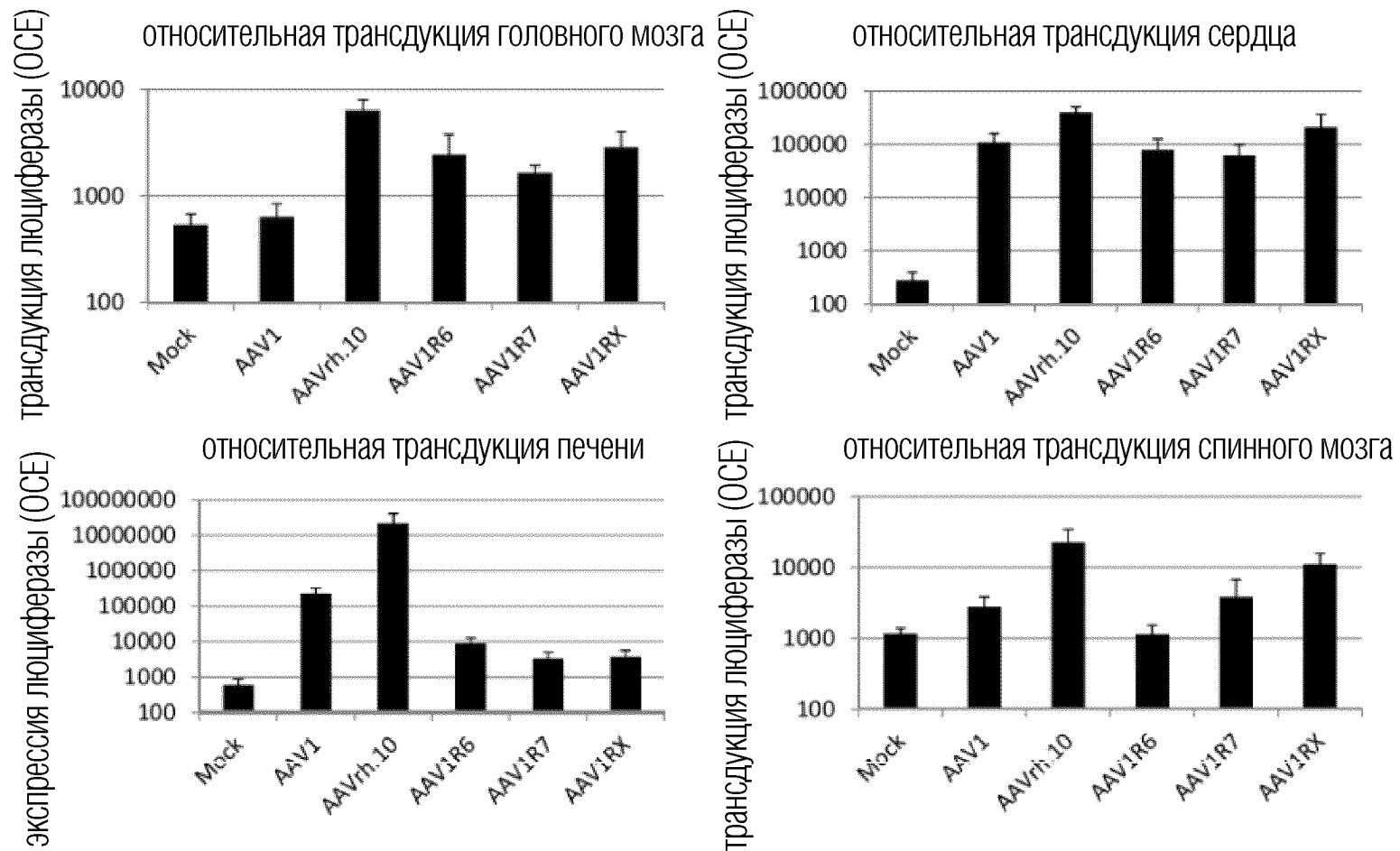
127. Способ по п.126, в котором вирусный вектор или композицию доставляют пациенту посредством внутривенного введения.



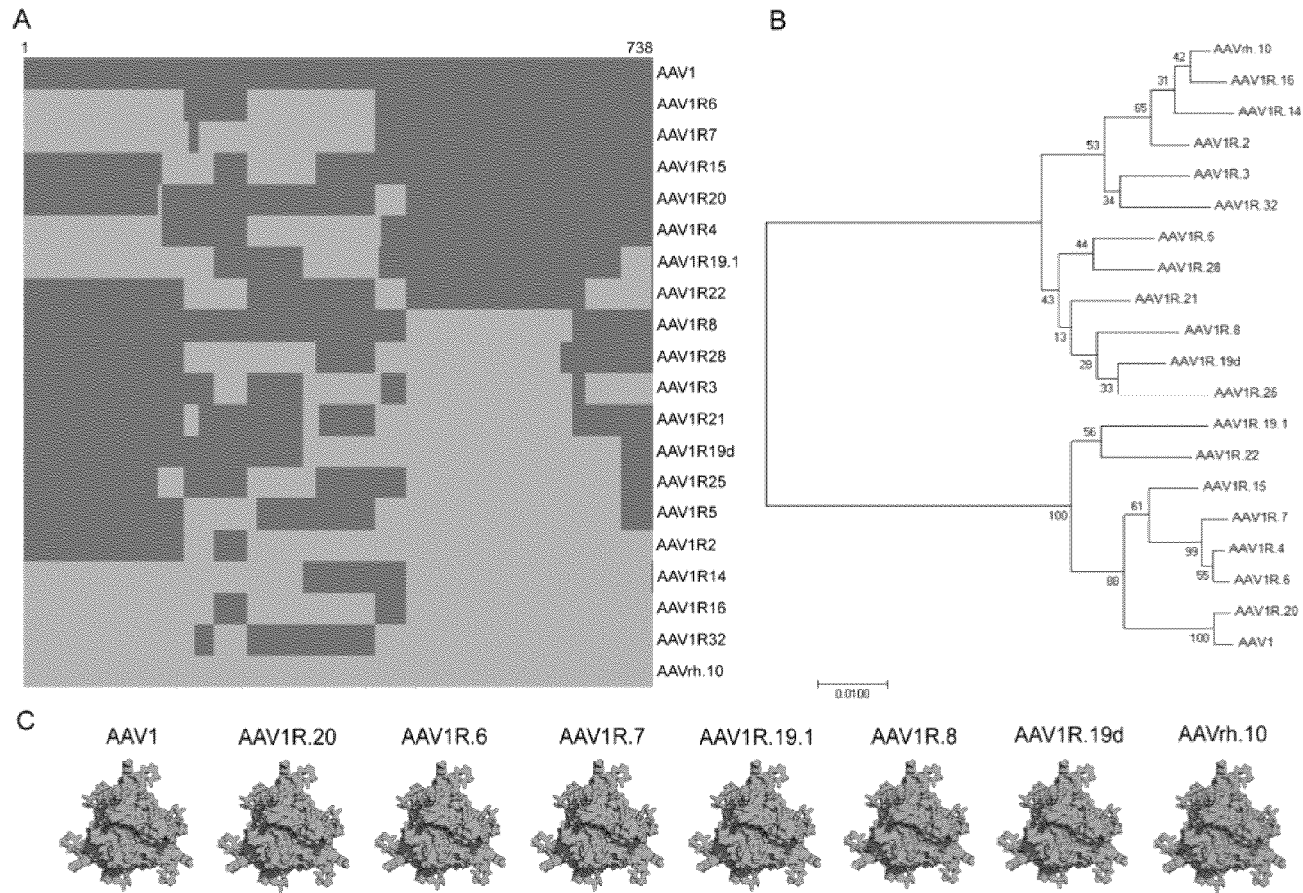
ФИГ. 1



ФИГ. 2

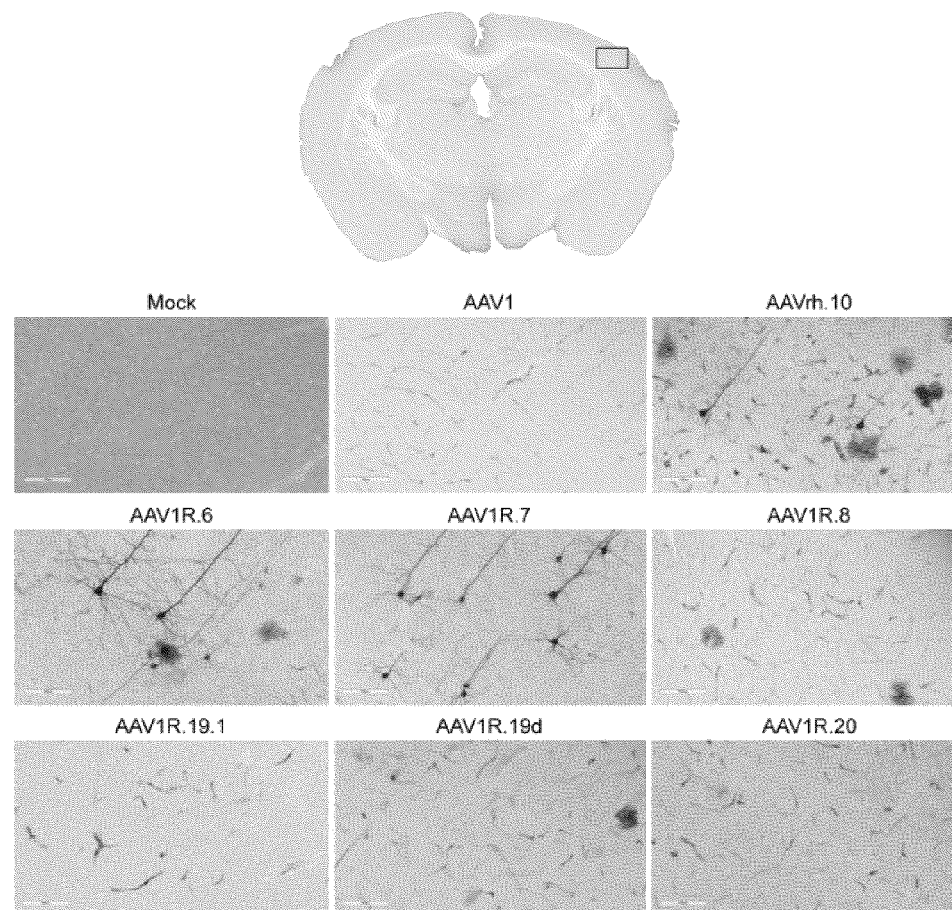


ФИГ. 3

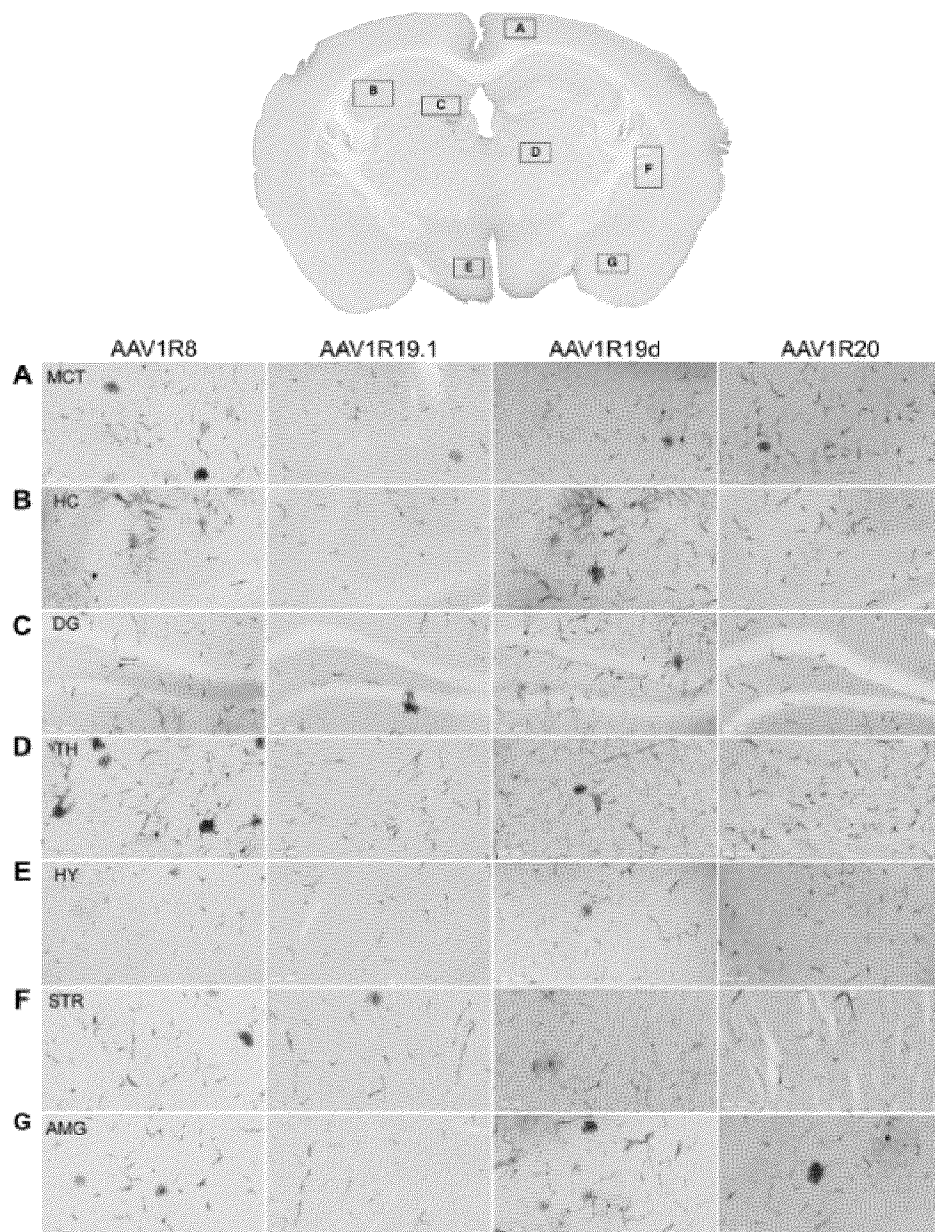


ФИГ. 4

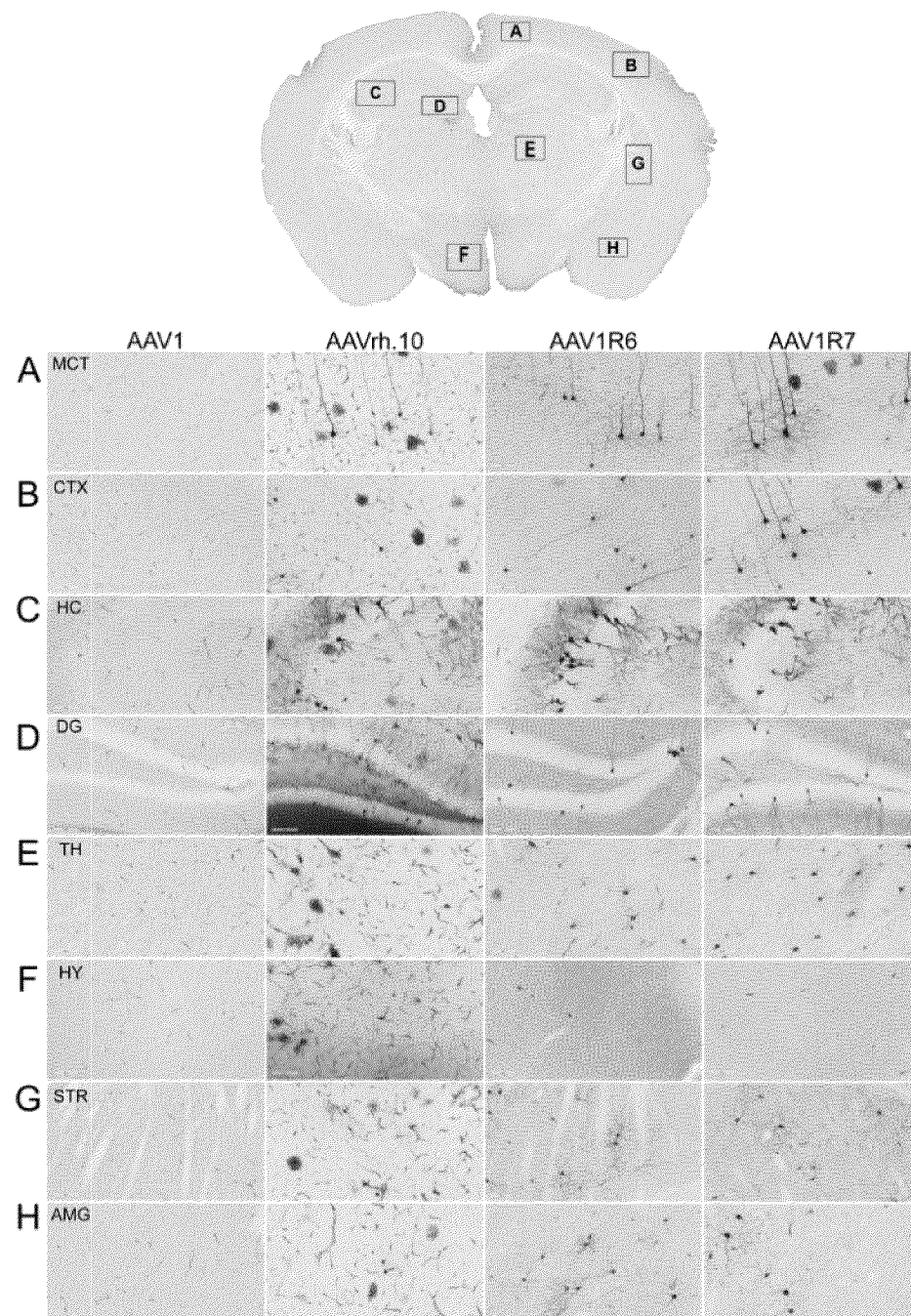




ФИГ. 5

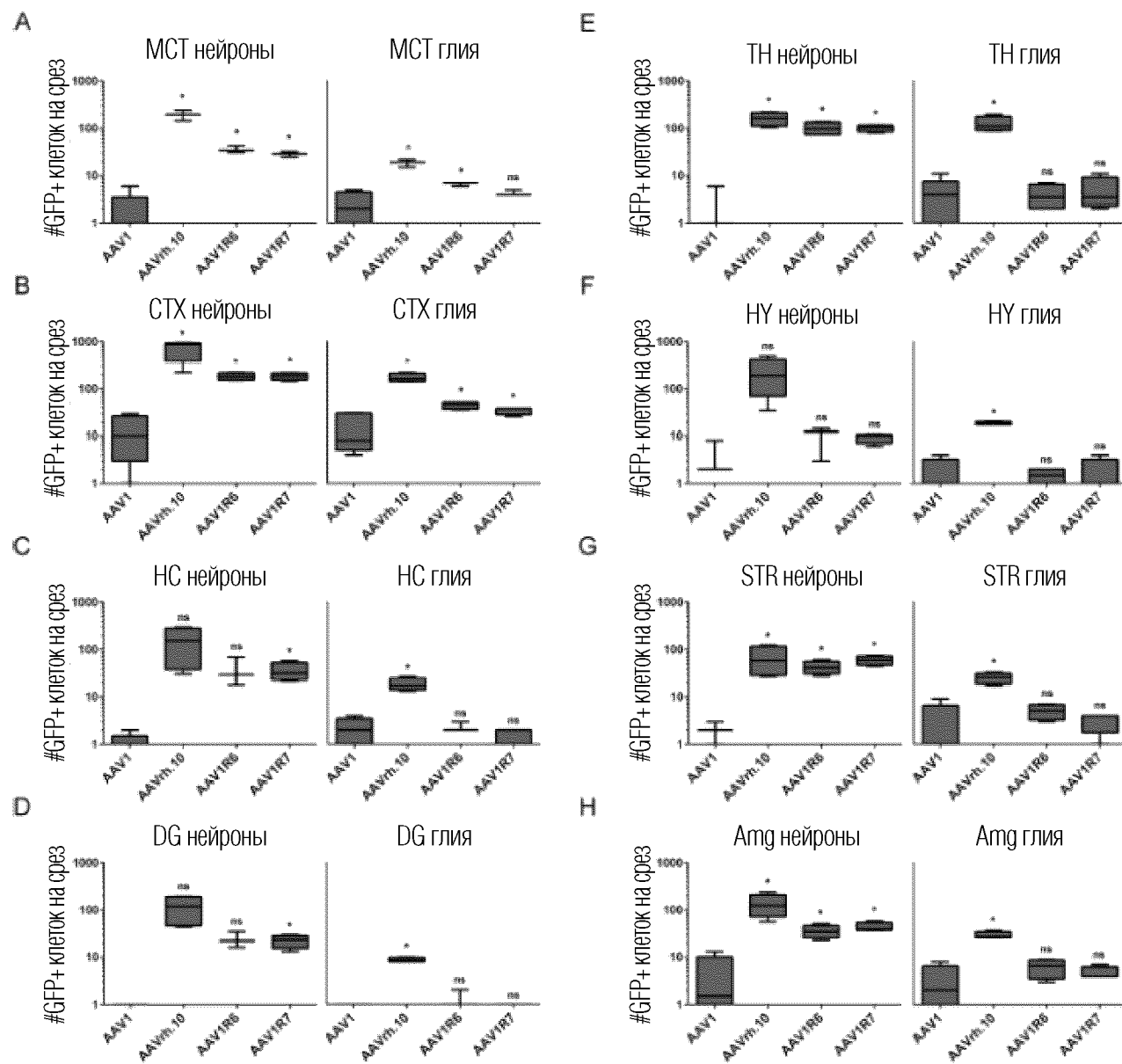


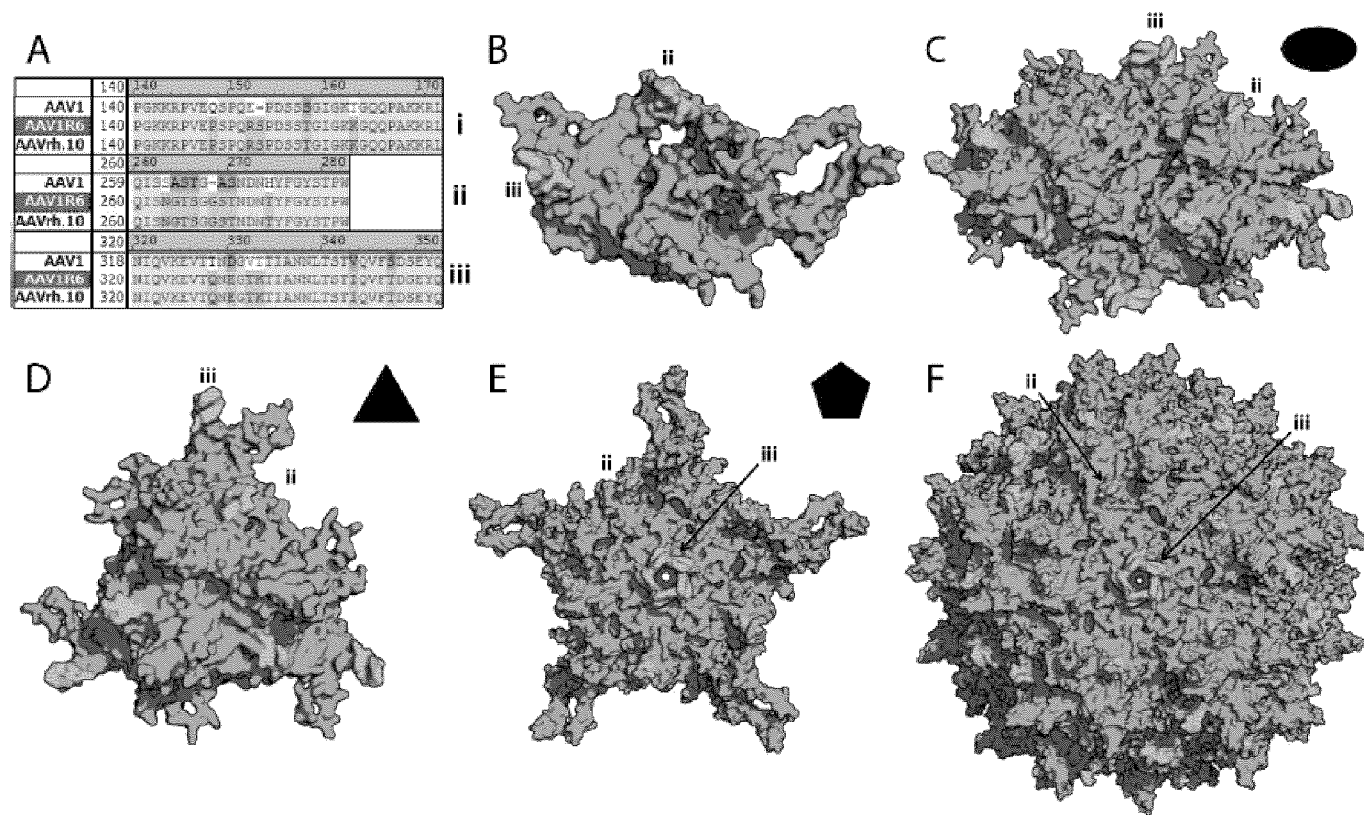
ФИГ. 6



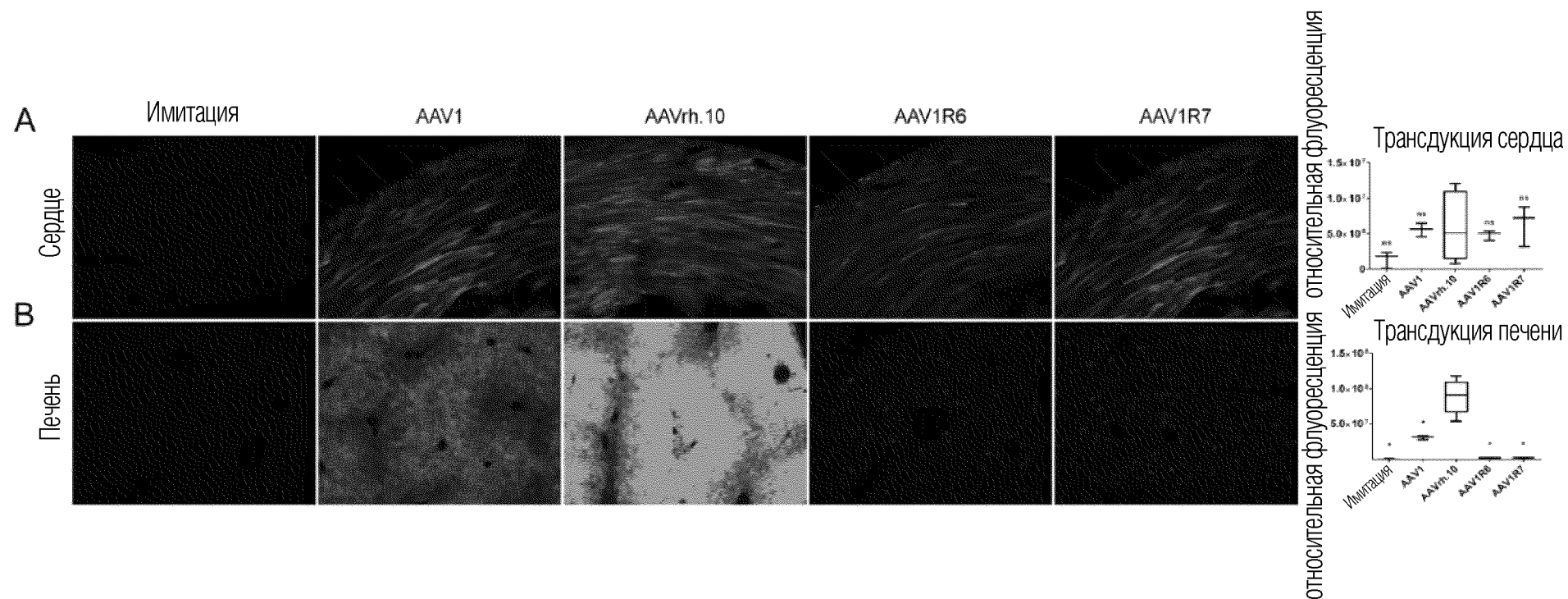
ФИГ. 7

ФИГ. 8





ФИГ. 9

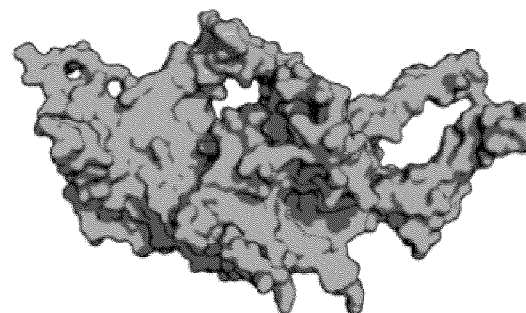


ФИГ. 10

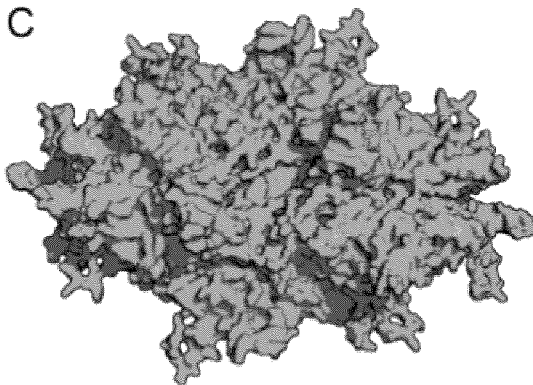
A

|                 | 260 | 260                     | 270 | 280 |
|-----------------|-----|-------------------------|-----|-----|
| <b>AAV1</b>     | 259 | QISSASTG-ASNDNHYFGYSTPW |     |     |
| <b>AAV1RX</b>   | 259 | QISNGTSGGSTNDNTYFGYSTPW |     |     |
| <b>AAVrh.10</b> | 260 | QISNGTSGGSTNDNTYFGYSTPW |     |     |

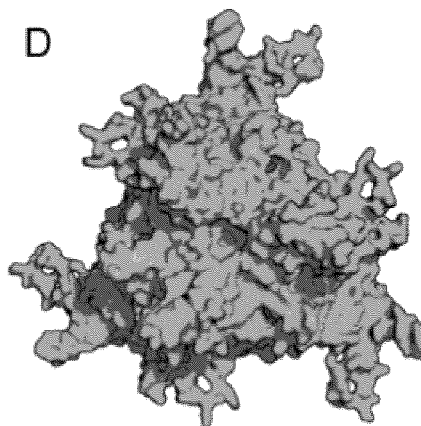
B



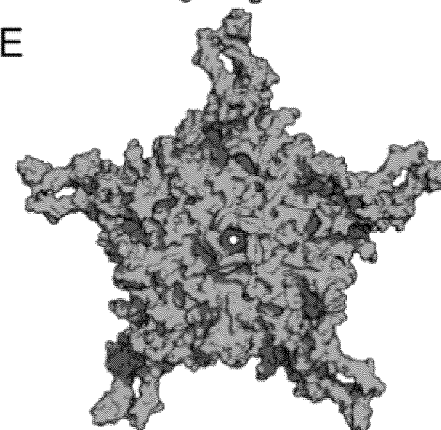
C



D

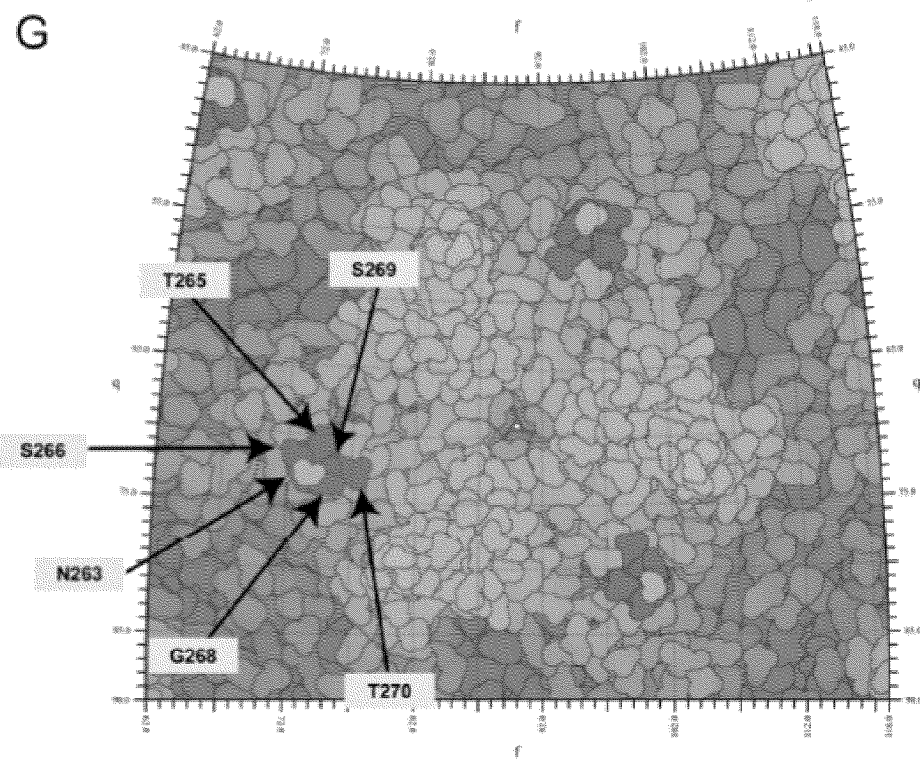
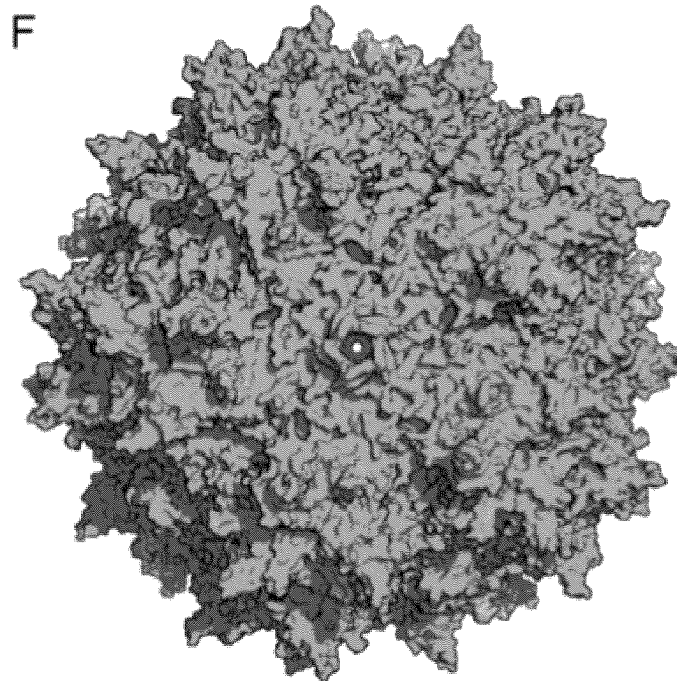


E



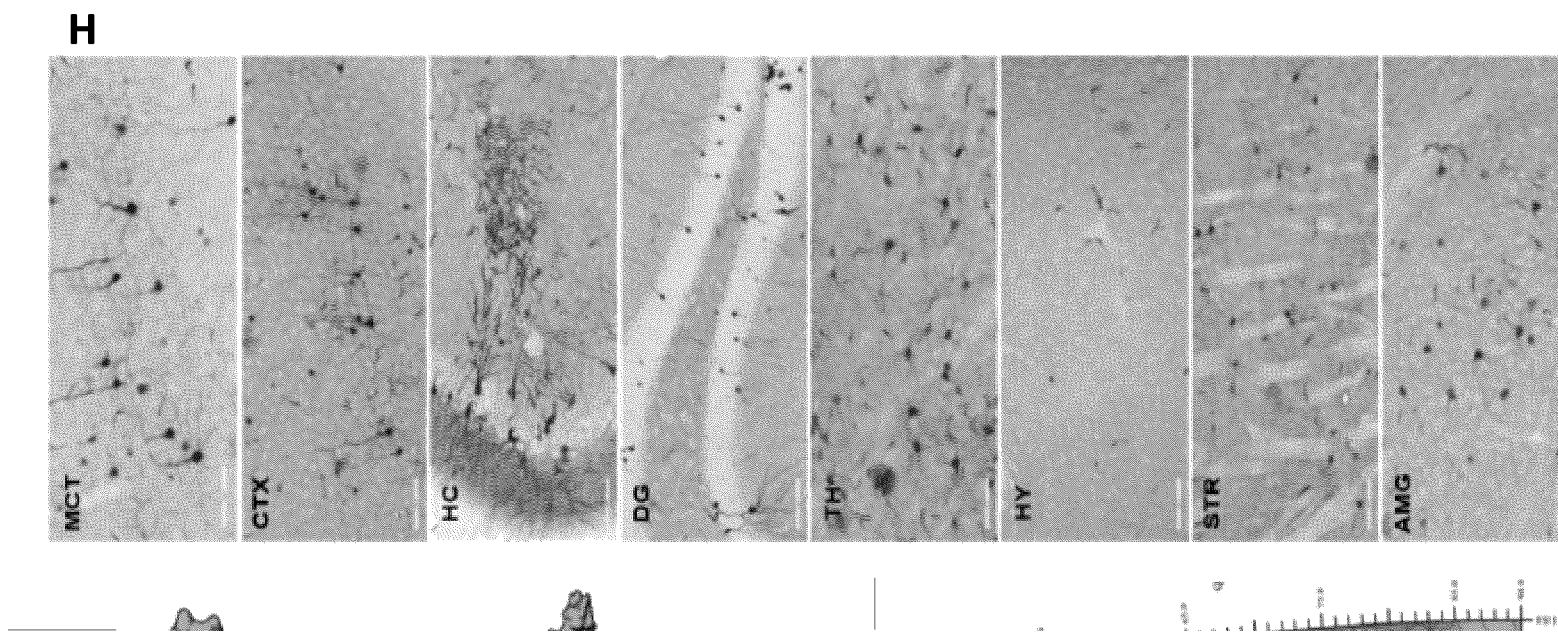
ФИГ. 11



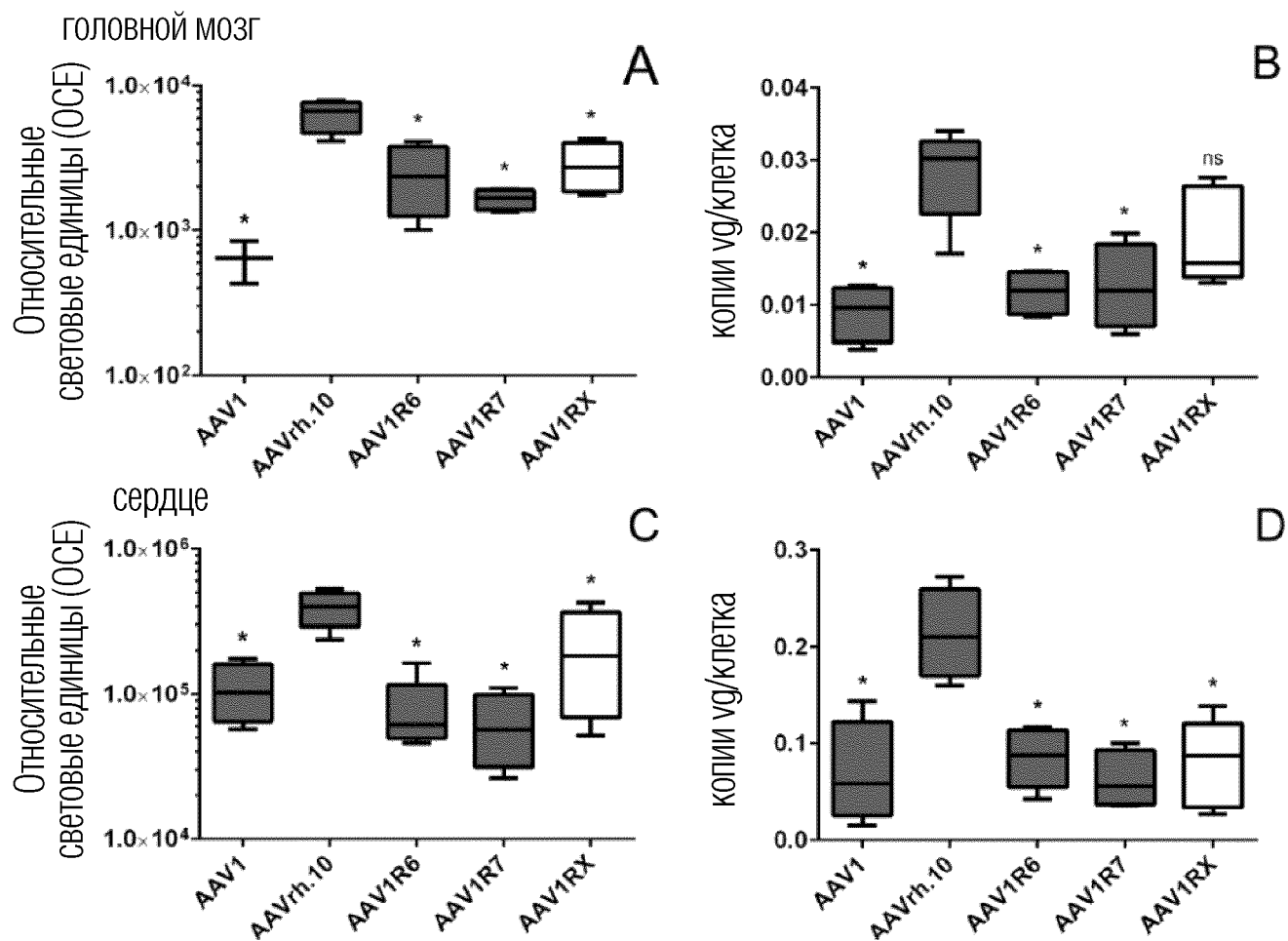


ФИГ. 11 (Продолжение)

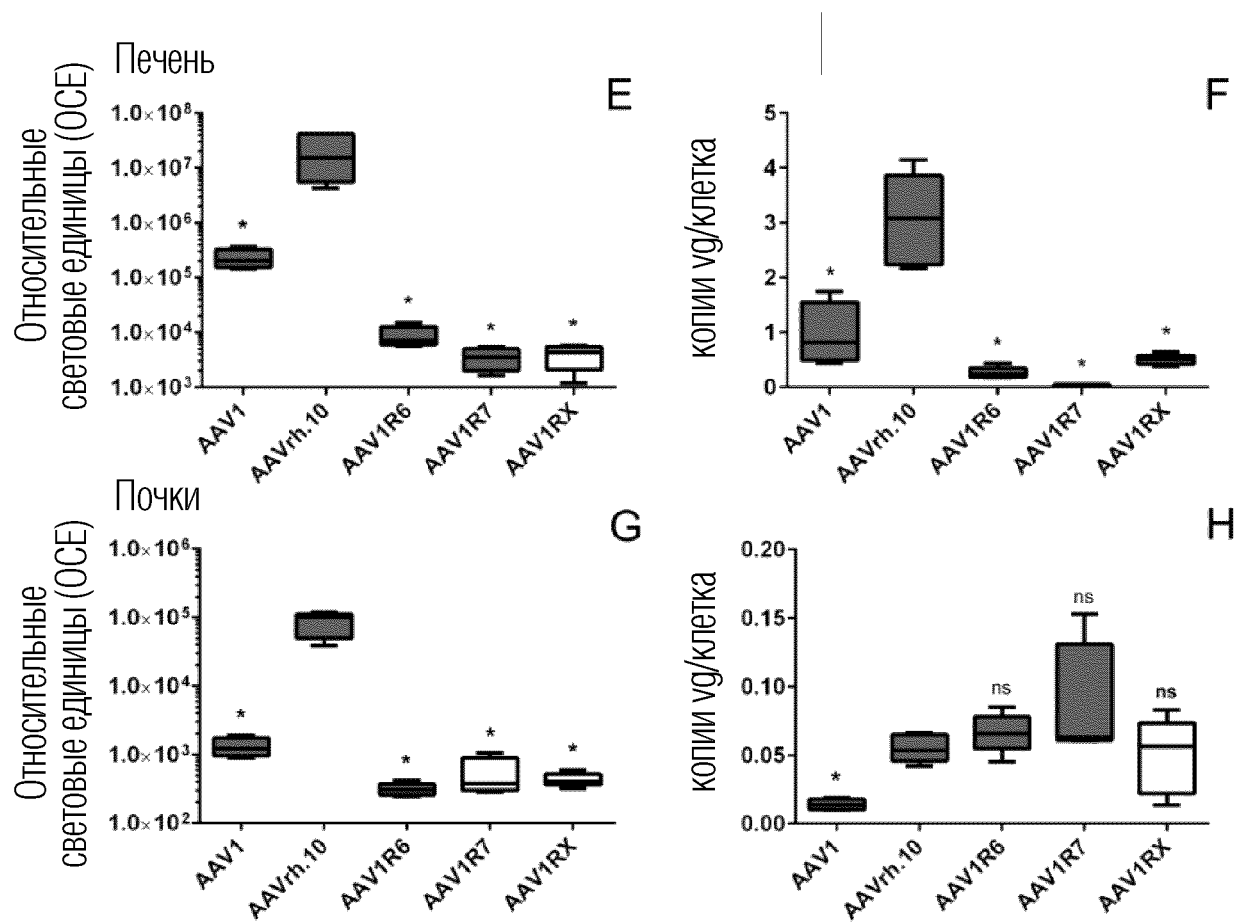




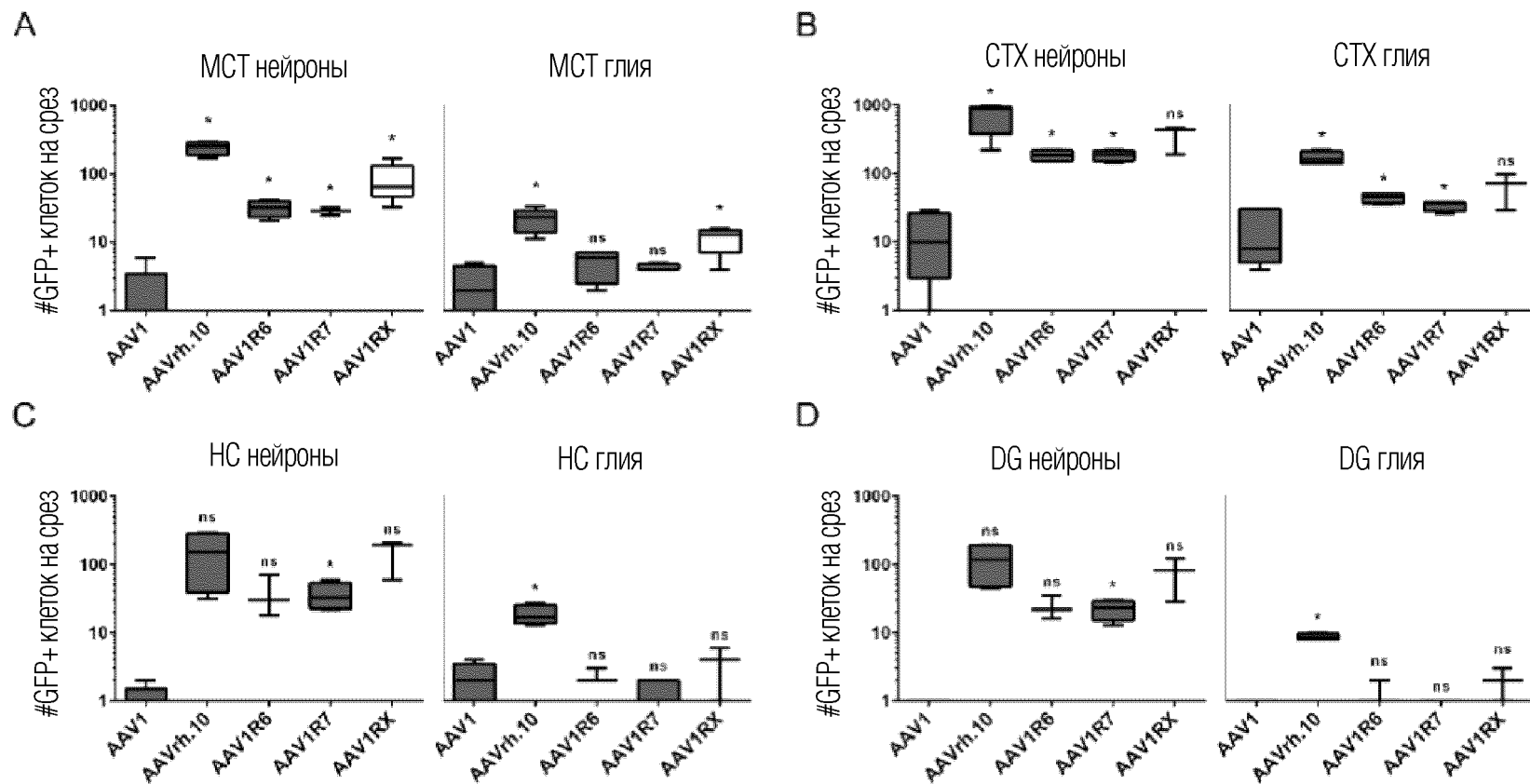
ФИГ. 11 (Продолжение)



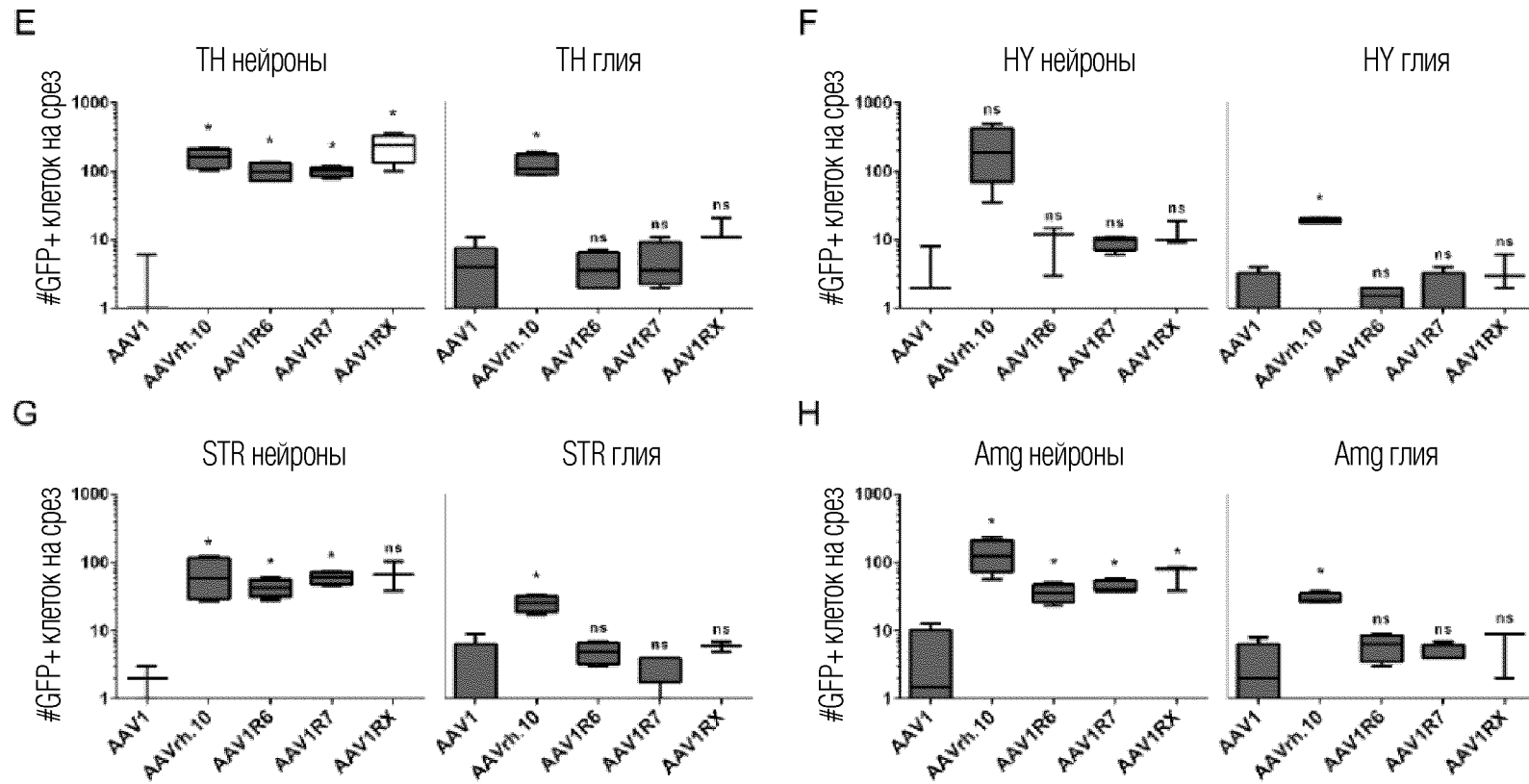
ФИГ. 12



ФИГ. 12 (Продолжение)



ФИГ. 13



ФИГ. 13 (Продолжение)

|                 | 260 | 260                      | 270 | 280 |
|-----------------|-----|--------------------------|-----|-----|
| <b>AAV1RX</b>   | 259 | QISNGTSGGSTINDNTYFGYSTPW |     |     |
| <b>AAV1</b>     | 259 | QISSASTG-ASNDNHYFGYSTPW  |     |     |
| <b>AAV2</b>     | 259 | QISSQS--GASNDNHYFGYSTPW  |     |     |
| <b>AAV3</b>     | 259 | QISSQS--GASNDNHYFGYSTPW  |     |     |
| <b>AAV4</b>     | 254 | RLGESLQS-----NTYNGESTPW  |     |     |
| <b>AAV5</b>     | 249 | EIKSGS-VDGSNANAYFGYSTPW  |     |     |
| <b>AAV6</b>     | 259 | QISSASTG-ASNDNHYFGYSTPW  |     |     |
| <b>AAV7</b>     | 260 | QISSETAG-STNDNTYFGYSTPW  |     |     |
| <b>AAV8</b>     | 260 | QISNGTSGGATNDNTYFGYSTPW  |     |     |
| <b>AAV9</b>     | 259 | QISNSTSGGSSNDNAYFGYSTPW  |     |     |
| <b>AAVrh.8</b>  | 259 | QISNGTSGGSTINDNTYFGYSTPW |     |     |
| <b>AAVrh.10</b> | 260 | QISNGTSGGSTINDNTYFGYSTPW |     |     |
| <b>AAVrh.39</b> | 260 | QISNGTSGGSTINDNTYFGYSTPW |     |     |
| <b>AAVrh.43</b> | 259 | QISNGTSGGATNDNTYFGYSTPW  |     |     |
| согласованное   | 260 | QISNGTSGGATNDNTYFGYSTPW  |     |     |

ФИГ. 14

|          |                                                          |
|----------|----------------------------------------------------------|
| AAV1     | MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGY        |
| AAV1r7   | MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGY        |
| AAVrh.10 | MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGY        |
| AAV1     | KYLGPFNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLYRNHADAEF       |
| AAV1r7   | KYLGPFNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLYRNHADAEF       |
| AAVrh.10 | KYLGPFNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLYRNHADAEF       |
| AAV1     | QERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVE[SP       |
| AAV1r7   | QERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVE[SP       |
| AAVrh.10 | QERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVE[SP       |
| AAV1     | Q[PDSS[GIGK[GQQPAKRLNFGQTGDS[ESVDPDPQ[GEPPATPAAVVG       |
| AAV1r7   | Q[PDSS[GIGK[GQQPAKRLNFGQTGDS[ESVDPDPQ[GEPPATPAAVVG       |
| AAVrh.10 | Q[PDSS[GIGK[GQQPAKRLNFGQTGDS[ESVDPDPQ[GEPPAGPSGLG        |
| AAV1     | PTTMA[GGGAPMADNNEGADGVG[SGNWHCDSTWLGDRVITTTSTRTWAL       |
| AAV1r7   | PTTMA[GGGAPMADNNEGADGVG[SGNWHCDSTWLGDRVITTTSTRTWAL       |
| AAVrh.10 | SGTMA[GGGAPMADNNEGADGVG[SGNWHCDSTWLGDRVITTTSTRTWAL       |
| AAV1     | PTYNNHLYKQIS[NDN[YFGYSTPWGYFDFNRFHCHFS[PRDWQ             |
| AAV1r7   | PTYNNHLYKQIS[NDN[YFGYSTPWGYFDFNRFHCHFS[PRDWQ             |
| AAVrh.10 | PTYNNHLYKQIS[NDN[YFGYSTPWGYFDFNRFHCHFS[PRDWQ             |
| AAV1     | RLINNNWGRPKRLNFKLFNIQVKEVT[NG[TIANNLTST[QVFFDSE          |
| AAV1r7   | RLINNNWGRPKRLNFKLFNIQVKEVT[NG[TIANNLTST[QVFFDSE          |
| AAVrh.10 | RLINNNWGRPKRLNFKLFNIQVKEVT[NG[TIANNLTST[QVFFDSE          |
| AAV1     | YQLPYVLGSAHQGC[LPPFPADVFMIPQYGYLT[LNNGSQA[VG[RS[SFYCLEY  |
| AAV1r7   | YQLPYVLGSAHQGC[LPPFPADVFMIPQYGYLT[LNNGSQA[VG[RS[SFYCLEY  |
| AAVrh.10 | YQLPYVLGSAHQGC[LPPFPADVFMIPQYGYLT[LNNGSQA[VG[RS[SFYCLEY  |
| AAV1     | FPSQMLRTGNNTFSYTFEEVPFHSSYAHSSQSLDRLMNLIDQYLYLNLNR       |
| AAV1r7   | FPSQMLRTGNNTFSYTFEEVPFHSSYAHSSQSLDRLMNLIDQYLYLNLNR       |
| AAVrh.10 | FPSQMLRTGNNFESYQFEDVPFHSSYAHSSQSLDRLMNLIDQYLYLSR         |
| AAV1     | TQNQSGSAQNKD[L[LSRGS[PAGMSVQPKNWLPGPCYRQQRVSKTKTDNNN     |
| AAV1r7   | TQNQSGSAQNKD[L[LSRGS[PAGMSVQPKNWLPGPCYRQQRVSKTKTDNNN     |
| AAVrh.10 | TQSTGGTAGTQQL[LSQAGPNNMSAQAKNWLPGPCYRQQRVSTT[LSQNNN      |
| AAV1     | SNFTWTGASKYN[INGRESI[INPGTAMASHKDD[KFFPMSGVMI[FGKESA     |
| AAV1r7   | SNFTWTGASKYN[INGRESI[INPGTAMASHKDD[KFFPMSGVMI[FGKESA     |
| AAVrh.10 | SNFAWTGATKYHLN[GRDSLVP[GVAMATHKDD[DEERFFPSSGVLMFGKQGA    |
| AAV1     | GASNTALDNVMTD[EEEEIKATNPVATERFGTVAVNFQSSSTDPATGDVHA      |
| AAV1r7   | GASNTALDNVMTD[EEEEIKATNPVATERFGTVAVNFQSSSTDPATGDVHA      |
| AAVrh.10 | GKDNVDYSSVMLTSEEEIKT[INPVATEQYGVVADNLQQQNAAP[IVGAVNS     |
| AAV1     | MGALPGMVWQDRD[VYLQGP[IWAKI[PHTDGHFHPSP[LMGGFGLKNPPPPQIIL |
| AAV1r7   | MGALPGMVWQDRD[VYLQGP[IWAKI[PHTDGHFHPSP[LMGGFGLKNPPPPQIIL |
| AAVrh.10 | QGALPGMVWQNRD[VYLQGP[IWAKI[PHTDGNFHPSP[LMGGFGLKHPPPPQIIL |
| AAV1     | IKNT[PVPANPPAEFSATK[FA[SI[ITQYSTGQVSVEI[EWELQKENS[KRWNP  |
| AAV1r7   | IKNT[PVPANPPAEFSATK[FA[SI[ITQYSTGQVSVEI[EWELQKENS[KRWNP  |
| AAVrh.10 | IKNT[PVPADPPTT[FSQAKL[ASFI[ITQYSTGQVSVEI[EWELQKENS[KRWNP |
| AAV1     | VQYTSNYAKSANVDFTVDNNGLYTEPRPIGTRYLTRPL                   |
| AAV1r7   | VQYTSNYAKSANVDFTVDNNGLYTEPRPIGTRYLTRPL                   |
| AAVrh.10 | IQYTSNYKSTNVDFAVNTDGTYSERPIGTRYLTRNL                     |