

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202090332** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.04.29

(51) Int. Cl. **C12N 15/86** (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.07.20

(54) УЛУЧШЕННАЯ ПРОДУКЦИЯ КАПСИДА AAV В КЛЕТКАХ НАСЕКОМЫХ

(31) **17182429.5**

(32) **2017.07.20**

(33) **EP**

(86) **PCT/EP2018/069704**

(87) **WO 2019/016349 2019.01.24**

(71) Заявитель:
ЮНИКЬЮРЕ АйПи Б.В. (NL)

(72) Изобретатель:

**Дю Плесси Давид Йоханнес Франсуа,
Тер Брейк Оливье, Босма Себастиан
Менно, Петри Харальд Петер
Альберт, Лубельский Яцек (NL)**

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

(57) Настоящее изобретение относится к продукции аденоассоциированных вирусных векторов в клетках насекомых. Клетки насекомых, таким образом, содержат первую нуклеотидную последовательность, кодирующую капсидные белки аденоассоциированного вируса (AAV), где иницирующий кодон для трансляции капсидного белка VP1 AAV представляет собой AUG. Выше открытой рамки считывания VP1 помещен альтернативный иницирующий кодон вне рамки таким образом, что инициация трансляции белка VP1 является модифицированной, т.е. уменьшенной, для обеспечения продукции VP1:VP2:VP3 в хорошем стехиометрическом соотношении, что приводит к AAV с высокой активностью.

A1

202090332

202090332

A1

УЛУЧШЕННАЯ ПРОДУКЦИЯ КАПСИДА AAV В КЛЕТКАХ НАСЕКОМЫХ

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к продукции аденоассоциированного вируса в клетках насекомых и к аденоассоциированному вирусу, который обеспечивает улучшенную инфекционность. Настоящее изобретение также относится к средствам и способам, включающим библиотеки аденоассоциированных вирусных векторов.

Уровень техники

Аденоассоциированный вирус (AAV) можно рассматривать в качестве одного из наиболее многообещающих вирусных векторов для генотерапии у человека. AAV имеет способность эффективно инфицировать делящиеся, так же как не делящиеся клетки человека, вирусный геном AAV интегрирует в одиночный хромосомный участок в геноме клетки-хозяина, и наиболее важно, даже несмотря на то, что AAV присутствует у многих людей, он никогда не был ассоциирован с каким-либо заболеванием. Принимая во внимание эти преимущества, рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) оценивают в клинических исследованиях генотерапии против гемофилии В, злокачественной меланомы, кистозного фиброза и других заболеваний. Многочисленные клинические исследования и апробированные генотерапевтические лекарственные средства в Европе, такие как Alipogene tiparvovec (Glybera[®], uniQure), дают надежду на то, что AAV станет основным стандартом клинической практики.

В целом, существует два главных типа систем продукции рекомбинантного AAV. С одной стороны, существуют общепринятые системы продукции в типах клеток млекопитающих (таких как клетки 293, клетки COS, клетки HeLa, клетки KB), и с другой стороны, системы продукции с использованием клеток насекомых.

Система продукции у млекопитающих страдает несколькими недостатками, которые могут включать ограниченное количество частиц rAAV, образуемое на клетку (порядка 10^4 частиц (обзор приведен в Clark, 2002, Kidney Int. 61(Suppl. 1): 9-15), и трудоемкое получение в большом масштабе. Для клинического исследования, может потребоваться более, чем 10^{15} частиц rAAV. Для получения этого количества частиц rAAV, может потребоваться трансфекция и культивирование с использованием приблизительно 10^{11} культивированных клеток 293 человека, эквивалент 5000 175-см² флаконов клеток, что означает трансфекцию вплоть до 10^{11} клеток 293. Таким образом, уже доказано, что крупномасштабное получение rAAV с использованием систем культуры клеток млекопитающих для получения материала для клинических исследований является проблематичным, получение в большом коммерческом масштабе может даже не являться осуществимым. Кроме того, всегда существует риск, что вектор для клинического использования, полученный в культуре клеток млекопитающего, может быть загрязнен нежелательным, возможно, патогенным, материалом, присутствующим в клетке-хозяине млекопитающего.

Для преодоления этих проблем систем продукции у млекопитающих разработана система продукции AAV с использованием клеток насекомых (Urabe et al., 2002, Hum. Gene Ther. 13: 1935-1943; US 20030148506 и US 20040197895). Капсиды AAV дикого типа из вируса дикого типа состоят из приблизительно 60 капсидных белков, т.е., VP1, VP2 и VP3 в стехиометрическом соотношении приблизительно 1:1:10. Без связи с теорией, считают, что стехиометрия является важной для достижения хорошей активности рекомбинантного AAV, т.е., хорошей трансдукции. В вирусе дикого типа, т.е., в клетках млекопитающих, достижение стехиометрического соотношения приблизительно 1:1:10 трех капсидных белков AAV (VP1, VP2 и VP3) основано на комбинации альтернативного использования двух акцепторных участков сплайсинга и менее оптимального использования иницирующего кодона ACG для VP2. Однако для продукции AAV в клетках насекомых являлись необходимыми модификации, поскольку стратегия экспрессии, как она осуществляется в клетках млекопитающих, не воспроизводится в клетках насекомых. Для получения улучшенной продукции капсидных белков в клетках насекомых в Urabe et al. (2002, выше) использовали конструкцию, которая транскрибируется в одиночную полицистронную матрицу, которая способна экспрессировать все три белка VP без необходимости сплайсинга, и в которой первый кодон инициации трансляции заменен на кодон ACG. В WO2007/046703 описано дополнительное улучшение инфекционности полученных с помощью бакуловируса векторов rAAV, посредством дополнительной оптимизации соотношения капсидных белков AAV в клетках насекомых.

В Urabe et al. (J. Virol., 2006, 80(4):1874-1885) отмечается, что частицы AAV5, полученные в бакуловирусной системе с использованием ACG в качестве иницирующего кодона капсидного белка VP1, имеют плохую эффективность трансдукции или активность, и что - в отличие от AAV2 с VP1, экспрессированным с иницирующего кодона ACG - мутагенез положения +4 до остатка G в кодирующей последовательности VP1 AAV5, не улучшал инфекционности. В Urabe et al. сконструировали химерные белки VP1 AAV2/5, где N-концевая часть из по меньшей мере 49 аминокислот VP1 AAV5 заменена на соответствующую часть VP1 AAV2, что улучшало свойства трансдукции вирионов.

В дополнительном способе экспрессию капсидных белков AAV улучшали посредством вставки в последовательность, кодирующую капсид AAV, одного или нескольких аминокислотных остатков между субоптимальным (не ATG) иницирующим трансляцию кодоном и кодоном, кодирующим аминокислотный остаток, соответствующий аминокислотному остатку в положении 2 аминокислотной последовательности капсида дикого типа (Lubelski et al. WO2015137802).

Несмотря на улучшения продукции капсидов на основе клеток насекомых для получения генотерапевтических векторов AAV для использования в медицинском лечении, все еще существует необходимость в дальнейшем улучшении продукции капсида AAV и в предоставлении новых способов отбора улучшенных конструкций

капсида AAV для экспрессии в клетках насекомых.

Описание изобретения

Краткое описание изобретения

Авторы настоящего изобретения в настоящее время неожиданно обнаружили, что капсиды AAV можно с высокой эффективностью получать в клетках насекомых из экспрессирующей конструкции, кодирующей транскрипт для белков VP1, VP2 и VP3 с перекрывающихся рамок считывания, где VP1 транслируется с иницирующего кодона AUG. Конструкции предшествующего уровня техники, содержащие иницирующий кодон ATG, не образуют соотношения VP1:VP2:VP3, подобное наблюдаемому для AAV дикого типа - приблизительно 1:1:10, и таким образом, без связи с теорией, не образуют активного AAV. Экспрессирующие конструкции, идентифицированные по настоящему изобретению, позволяют эффективную продукцию в клетках насекомых хороших количеств высокоактивных генотерапевтических векторов AAV для использования в медицинском лечении. Такие векторы являются по меньшей мере сходными, если не улучшенными, применительно к активности и количеству, по сравнению с генотерапевтическими векторами AAV, продуцированными с альтернативных иницирующих кодонов, таких как CTG или GTG (см. фигуру 4).

Соответственно, конструкции по изобретению содержат дополнительный иницирующий кодон вне рамки считывания на 5' от иницирующего кодона ATG VP1, что, по-видимому, приводит к уменьшению инициации трансляции на иницирующем кодоне VP1, позволяя трансляцию достаточных количеств VP1, VP2 и VP3. Без связи с теорией, такие конструкции могут позволять экспрессию аминокислотных последовательностей VP1, VP2 и VP3, как они обнаружены в вирусе дикого типа.

Как показано в примерах, такие конструкции идентифицировали с использованием библиотеки экспрессирующих капсид AAV конструкций для клеток насекомых. Конструкции отбирали, во-первых, по необходимости высокоэффективной продукции капсидов AAV в клетках насекомых, и во-вторых, по необходимости высокой инфекционности для выбранных клеток-мишеней. Таким образом, авторы настоящего изобретения предоставляют также высокоэффективный способ отбора для получения экспрессирующих капсид AAV конструкций, имеющих улучшенные свойства, например, улучшенную продукцию и/или улучшенную инфекционность.

Таким образом, в первом аспекте настоящее изобретение относится к конструкции нуклеиновой кислоты, содержащей последовательности для контроля экспрессии, для экспрессии в клетке насекомого нуклеотидной последовательности, содержащей открытую рамку считывания, где последовательность открытой рамки считывания кодирует:

- i) капсидные белки VP1, VP2 и VP3 аденоассоциированного вируса (AAV); и
- ii) иницирующий трансляцию кодон AUG для VP1;

где указанная нуклеотидная последовательность содержит, выше открытой рамки считывания, альтернативный иницирующий кодон, находящийся вне рамки

применительно к открытой рамке считывания. Иными словами, альтернативный иницирующий кодон находится, предпочтительно, на 3N+1 или 3N+2 нуклеотидов выше иницирующего кодона.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу получения конструкции нуклеиновой кислоты, кодирующей парвовирусный капсидный белок для продукции в клетках насекомых, где указанная конструкция нуклеиновой кислоты имеет одно или несколько улучшенных свойств, где способ включает:

а) получение множества конструкций нуклеиновой кислоты, где каждая конструкция содержит:

нуклеотидную последовательность, кодирующую парвовирусный капсидный белок, функционально связанную с последовательностью для контроля экспрессии и по меньшей мере одной последовательностью парвовирусного инвертированного концевой повтора (ITR), фланкирующей указанную нуклеотидную последовательность, кодирующую парвовирусный капсидный белок, функционально связанную с последовательностью для контроля экспрессии;

б) перенос множества конструкций нуклеиновой кислоты в клетки насекомых, способные экспрессировать парвовирусный белок Rep;

с) воздействие на клетки насекомых условий, обеспечивающих экспрессию парвовирусного капсидного белка и парвовирусного белка rep, таким образом, что конструкции нуклеиновой кислоты можно упаковывать в парвовирусные капсиды для получения парвовирусных вирионов;

д) выделение парвовирусных вирионов из клеток насекомых и/или супернатанта клеток насекомых;

е) приведение указанных парвовирусных вирионов в контакт с клеткой-мишенью для обеспечения инфекции клетки-мишени;

ф) выделение конструкций нуклеиновой кислоты из клеток-мишеней.

Описание фигур

Фигура 1: Схематическое представление способа получения библиотеки и отбора.

(а) Во-первых, получают библиотеку ДНК. В этом конкретном примере, библиотеку экспрессирующих конструкций, имеющих множество иницирующих кодонов (XXX) для VP1 AAV5 и имеющих случайные нуклеотиды в выбранных положениях (N) (SEQ ID NO:71), примеры таких конструкций перечислены (1 представляет собой SEQ ID NO:1; 2 представляет собой SEQ ID NO:63; n представляет собой SEQ ID NO:65); (б) библиотеку ДНК переносят в векторные конструкции, имеющие экспрессирующие кассеты с промотором (P) для экспрессии капсидных белков VP1, VP2 и VP3 AAV5 (Cap (VP123)), где указанные экспрессирующие кассеты фланкированы двумя инвертированными концевыми повторами (ITR) AAV, для обеспечения капсидирования в капсид AAV. Также, получают экспрессирующую кассету(кассеты) для Rep52 и Rep78; (с) Указанные конструкции Cap и Rep затем переносят в клетки насекомых, в этом случае, клетки Sf9. Указанный перенос можно осуществлять посредством бакуловирусного вектора, который

позволяет контроль множественности инфекции; (d) Таким образом, в клетке насекомого, белки Rep52 и Rep78, которые экспрессируются, осуществляют репликацию и инкапсидирование геномов векторов AAV, содержащих экспрессирующие капсид кассеты. Как указано, когда используют бакуловирусный вектор, множественность инфекции можно хорошо контролировать и, предпочтительно, ее сохраняют сильно ниже 1 для конструкции Cap, для получения в среднем только одного члена библиотеки на клетку Sf9, чтобы избежать перекрестной упаковки. Только экспрессирующие Cap кассеты, которые эффективно продуцируют капсиды, могут инкапсидировать геномы вектора; (e) Затем, капсиды, содержащие геномы вектора, тестируют по инфекционности, т.е. эффективному переносу генома вектора в клетку-мишень. Частица вектора с геномом вектора может, например, являться неинфекционной, в то время как частица вектора с геномом вектора и соотношением VP1:VP2:VP3 приблизительно 1:1:10 является высокоинфекционной. В этом примере используют линию клеток HeLaRC32, которая также является способной к репликации геномов вектора AAV. Из клеток-мишеней геномы вектора можно затем идентифицировать. Например, можно определять последовательность генома вектора или ее часть, содержащую изменчивую последовательность как показано в (a). Альтернативно, можно определять последовательность идентификатора для идентификации членов библиотеки из (a), подвергнутых успешной инфекции клетки-мишени.

Таким образом, в комбинации, стадии (c) и (e) позволяют отбор экспрессирующих капсид конструкций, которые позволяют эффективную продукцию в клетках насекомых и которые продуцируют инфекционные вирионы в клетке-мишени. Отобранные экспрессирующие конструкции, доминирующие в популяции, могут являться особенно подходящими кандидатами. Отобранные экспрессирующие конструкции-кандидаты (без фланкирующих ITR) можно затем использовать, например, в бакуловирусном векторе или вводить в линию клеток, для получения генотерапевтических векторов AAV.

Фигура 2: На этом графике показан процент (y-ось) членов библиотеки, имеющих конкретный иницирующий кодон (x-ось), на каждой стадии способа отбора; А) На этом графике показано распределение иницирующих кодонов полученной библиотеки плазмидной ДНК, имеющей экспрессирующие кассеты, фланкированные ITR AAV. Распространенность меняется между приблизительно 4% и приблизительно 8%; В) На этом графике показано распределение иницирующих кодонов библиотеки бакуловирусов, полученной с вставленными экспрессирующими кассетами, фланкированными ITR AAV. Распространенность меняется между приблизительно 4% и приблизительно 9%, следует отметить, что профиль распределения этой библиотеки является очень сходным с плазмидной библиотекой; С) На этом графике показано распределение иницирующих кодонов, содержащихся в библиотеке AAV, полученной из библиотеки бакуловирусов из фигуры 2В). Следует отметить, что распределение иницирующих кодонов является очень сходным с библиотекой бакуловирусов, находясь в диапазоне от приблизительно 4% до 9%, за одним исключением, т.е. иницирующим

кодоном ATG, который имеет распространенность сильно ниже 0,5%; D) На этом графике показано распределение иницирующих кодонов, содержащихся в геноме вектора AAV в клетках, инфицированных с использованием библиотеки AAV из фигуры 2C). Следует отметить, что распределение иницирующих кодонов в настоящее время является очень различным. CTG и GTG являются наиболее преобладающими иницирующими кодонами, имеющими распространенность приблизительно 50%. Иницирующий кодон ATG, мало представленный в библиотеке AAV, в настоящее время имеет распространенность приблизительно 8%, в то время как оставшиеся иницирующие кодоны имели распространенность между приблизительно 1% и 3%; E) этот график объединяет соответствующие графики из фигур 2A)-D). Следует отметить спад для кодона ATG для библиотеки AAV и пики для CTG, GTG и ATG в библиотеке клеток.

Фигура 3. Отобранные последовательности (ATG1, ATG2 и т.д.) затем клонировали в бакуловирусном векторе для экспрессии капсидов AAV5. Клоны бакуловирусных векторов затем анализировали посредством SDS-PAGE для оценки соотношений VP1:VP2:VP3. Для CTG1 не получили хороших клонов, в то время как для CTG2 и GTG2 получили, показав стехиометрическое соотношение, как показано ранее (Lubelski et al., WO2015137802). Клоны TAG продуцировали низкие титры, и клоны TGA, по-видимому, не продуцировали VP1. Неожиданно, для ATG1 и ATG2 получены хорошие клоны, имеющие стехиометрическое соотношение, сходное с CTG2.

Фигура 4. Анализ активности AAV. Относительную активность различных векторов AAV, несущих репортерный ген SEAP под контролем промотора CMV, тестировали в клетках Huh7 (A) и в клетках HeLa (B). Клетки инфицировали с различной множественностью инфекции (10^6 , 10^5 , 10^4 геномных копий AAV (гк) на клетку) и определяли экспрессию репортерного гена SEAP. Для конструкции ATG1 получили наиболее активный вектор, в то время как ATG2, CTG2 и GTG2 имели сходные профили, в то время как TGA была значительно менее активной, поскольку она не содержала, или почти не содержала никакого белка VP1. Вектор AAV GTG1 продуцировал низкий титр гк/мл и таким образом, не позволял инфекцию с MOI 10^6 .

Фигура 5. Схема контекста последовательности ATG для эффективной экспрессии капсидного белка AAV. A) Верхние блоки показывают слева направо кодоны в открытой рамке считывания для VP1. Блок с иницирующим кодоном VP1 содержит «ATG». Нижние блоки находятся не в рамке с открытой рамкой считывания для VP1. Выше кодона atg находится альтернативный иницирующий кодон (старт), и ниже него - также стоп-кодон (стоп). B) Показана последовательность преобладающей последовательности, отобранной из библиотеки (SEQ ID NO:1). В перекрывающейся вне рамки считывания (OOF) иницирующий кодон ATG обнаружен выше находящейся в рамке рамки считывания для Cap. OOF имеет стоп-кодон TGA ниже в последовательности, происходящей из последовательности AAV5 дикого типа, что приводит в результате к короткому пептиду из 6 аминокислот, MHHGK (SEQ ID NO:72), при трансляции с иницирующего кодона OOF; C) Показаны последовательности дополнительных

перекрывающихся вне рамки рамок считывания с другого находящегося выше иницирующего кодона. В случае сверху присутствует иницирующий кодон CTG вне рамки (SEQ ID NO:2) со стоп-кодоном далее ниже в последовательности, происходящей из последовательности AAV5 (см., среди прочего, SEQ ID NO:70). Это может приводить к трансляции большей белковой последовательности из приблизительно 158 аминокислот с терминацией на стоп-кодоне TAG. В случае снизу присутствует также иницирующий кодон CTG со стоп-кодоном в мутантной последовательности сразу ниже иницирующего кодона, что приводит в результате к короткому пептиду из 4 аминокислот, MEIW (SEQ ID NO:73), при трансляции с OOF (SEQ ID NO:9); D) Схема экспрессии капсидных белков VP1, VP2 и VP3 с конструкций, как изображено на фигуре 5А-С. ДНК содержит экспрессирующую кассету с промотором (P) и открытую рамку считывания для капсидных белков (Cap(VP123)). Инициация транскрипции указана стрелкой. Транскрипция приводит к мРНК, с которой сначала может транслироваться белок OOF, и затем капсидные белки VP1, VP2 и VP3. Последовательность OOF перекрывается со стартом трансляции VP1.

Фигура 6. Схема различных конфигураций векторов-носителей для получения библиотеки AAV. На фигуре 6А: показана конфигурация, как используют в примерах, где экспрессирующая кассета, экспрессирующая капсидные белки AAV (серый блок) содержится между ITR AAV и внутри генома бакуловируса. AAV, полученный из нее, содержит геном вектора с ITR, фланкирующими экспрессирующую кассету. На фигуре 6В: показана конфигурация, где вектор-носитель (например, бакуловир) содержит экспрессирующую кассету для парвовирусных капсидных белков, и где между последовательностями ITR генома вектора помещен идентификатор последовательности (ID). AAV, полученный из нее, содержит геном вектора с ITR, фланкирующими идентификатор последовательности. Посредством идентификации идентификатора последовательности, например, посредством секвенирования, поскольку последовательность Cap и ID связаны, соответствующую последовательность cap, поскольку ID и последовательность Cap ассоциированы в одном геноме, можно определять, например, посредством секвенирования бакуловирусного вектора, содержащего их обе, или поскольку бакуловирусный вектор сконструирован таким образом, что комбинация идентификатора последовательности и экспрессирующей Cap последовательности заведомо известна. Фигура 6С Конструкции могут также содержать репортерный ген в геноме парвовирусного вектора.

Определения

В рамках изобретения термин «функционально связанный» относится к связи элементов полинуклеотида (или полипептида) в функциональной взаимосвязи. Нуклеиновая кислота является «функционально связанной», когда она помещена в функциональную взаимосвязь с другой последовательностью нуклеиновой кислоты. Например, последовательность для регуляции транскрипции является функционально связанной с кодирующей последовательностью, если она вызывает транскрипцию

кодирующей последовательности. Функционально связанный означает, что связанные последовательности ДНК являются, как правило, непрерывными и, при необходимости соединения двух кодирующих белок областей, непрерывными и находящимися в рамке считывания.

«Последовательность для контроля экспрессии» относится к последовательности нуклеиновой кислоты, регулирующей экспрессию нуклеотидной последовательности, с которой она функционально связана. Последовательность для контроля экспрессии является «функционально связанной» с нуклеотидной последовательностью, когда последовательность для контроля экспрессии контролирует и регулирует транскрипцию и/или трансляцию нуклеотидной последовательности. Таким образом, последовательность для контроля экспрессии может включать промоторы, энхансеры, внутренние участки связывания рибосомы (IRES), терминаторы транскрипции, иницирующий кодон перед кодирующим белком геном, сигнал сплайсинга для интронов и стоп-кодона. Термин «последовательность для контроля экспрессии» предназначен для включения, как минимум, последовательности, присутствие которой разработано для влияния на экспрессию, и может также включать дополнительные обеспечивающие преимущество компоненты. Например, лидерные последовательности и последовательности партнера по слиянию являются последовательностями для контроля экспрессии. Термин может также включать дизайн последовательности нуклеиновой кислоты таким образом, что нежелательные, потенциальные иницирующие кодоны внутри и вне рамки считывания, удалены из последовательности. Это может также включать дизайн последовательности нуклеиновой кислоты таким образом, что нежелательные, потенциальные участки сплайсинга удалены. Это включает последовательности или последовательности полиаденилирования (pA), управляющие добавлением полиА-хвоста, т.е., отрезка из остатков аденина на 3'-конце мРНК, последовательностей, обозначаемых как полиА-последовательности. Это может также быть разработано для увеличения стабильности мРНК. Последовательности для контроля экспрессии, влияющие на стабильность транскрипции и трансляции, например, промоторы, так же как последовательности, влияющие на трансляцию, например, последовательности Козака, известны для клеток насекомых. Последовательности для контроля экспрессии могут иметь такой характер, чтобы модулировать нуклеотидную последовательность, с которой они функционально связаны, таким образом, чтобы достигать более низких уровней экспрессии или более высоких уровней экспрессии.

В рамках изобретения термин «промотор» или «последовательность для регуляции транскрипции» относится к фрагменту нуклеиновой кислоты, который функционирует для контроля транскрипции одной или нескольких кодирующих последовательностей, и локализован выше, по отношению к направлению транскрипции, от участка инициации транскрипции кодирующей последовательности, и структурно идентифицирован по присутствию участка связывания ДНК-зависимой РНК-полимеразы, участков инициации транскрипции и любых других последовательностей ДНК, включая, но без ограничения,

участки связывания факторов транскрипции, участки связывания репрессорного и активаторного белка, и любые другие последовательности нуклеотидов, как известно специалисту в данной области, действующие напрямую или опосредовано для регуляции уровня транскрипции с промотора. «Конститутивный» промотор представляет собой промотор, являющийся активным в большинстве тканей, в большинстве физиологических условий и условий развития. «Индукцируемый» промотор представляет собой промотор, регулируемый физиологически или по мере развития, например, посредством воздействия химического индуктора. «Тканеспецифический» промотор является активным только в специфических типах тканей или клеток.

Термины «значительно идентичные», «значительная идентичность» или «в основном сходные», или «сходство в основном» означают, что две пептидные или нуклеотидные последовательности, при оптимальном выравнивании, например, посредством программ GAP или BESTFIT с использованием параметров по умолчанию, разделяют по меньшей мере определенный процент идентичности последовательностей, как определено в другом месте в настоящем описании. В GAP используют алгоритм глобального выравнивания Нидлмана и Вунша для выравнивания двух последовательностей на протяжении всех их длины, максимизирующий количество совпадений и минимизирующий количество пропусков. Как правило, используют параметры GAP по умолчанию, со штрафом за открытие пропуска=50 (нуклеотиды)/8 (белки) и штрафом за продолжение пропуска=3 (нуклеотиды)/2 (белки). Для нуклеотидов используемой по умолчанию матрицей баллов является *pnwsgapdna*, и для белков используемой по умолчанию матрицей баллов является *Blosum62* (Henikoff & Henikoff, 1992, PNAS 89, 915-919). Понятно, что когда указано, что последовательности РНК являются в основном сходными или имеют определенную степень идентичности последовательности с последовательностями ДНК, тимин (Т) в последовательности ДНК считают эквивалентным урацилу (U) в последовательности РНК. Выравнивания последовательностей и показатели процента идентичности последовательностей можно определять с использованием компьютерных программ, таких как пакет GCG Wisconsin, версии 10.3, доступный из Accelrys Inc., 9685 Scranton Road, San Diego, CA 92121-3752 USA, или программного обеспечения с открытым исходным кодом Emboss для Windows (текущая версия 2.7.1-07). Альтернативно, процент сходства или идентичности можно определять посредством поиска в базах данных, с использованием таких алгоритмов, как FASTA, BLAST и т.д.

Нуклеотидные последовательности, кодирующие парвовирусные белки Rep или белки Cap по изобретению можно также определять по их способности гибридизоваться с соответствующими им нуклеотидными последовательностями, в условиях гибридизации умеренной строгости, или предпочтительно, в строгих условиях гибридизации. Строгие условия гибридизации определяют в настоящем описании как условия, позволяющие последовательности нуклеиновой кислоты из по меньшей мере приблизительно 25, предпочтительно, приблизительно 50 нуклеотидов, 75 или 100 и наиболее

предпочтительно, из приблизительно 200 или более нуклеотидов, гибридизоваться при температуре приблизительно 65°C в растворе, содержащем приблизительно 1 М соль, предпочтительно, в 6 x SSC, или в любом другом растворе, имеющем сравнимую ионную силу, и при отмывке при 65°C в растворе, содержащем приблизительно 0,1 М соль, или менее, предпочтительно, 0,2 x SSC, или любом другом растворе, имеющем сравнимую ионную силу. Предпочтительно, гибридизацию проводят в течение ночи, т.е. по меньшей мере в течение 10 часов, и предпочтительно, промывку проводят в течение по меньшей мере одного часа, по меньшей мере с двумя заменами раствора для промывки. Эти условия обычно позволяют специфическую гибридизацию последовательностей, имеющих приблизительно 90% или более идентичности последовательности.

Умеренные условия определяют в настоящем описании как условия, позволяющие последовательности нуклеиновой кислоты из по меньшей мере 50 нуклеотидов, предпочтительно, из приблизительно 200 или более нуклеотидов, гибридизоваться при температуре приблизительно 45°C в растворе, содержащем приблизительно 1 М соль, предпочтительно 6 x SSC, или в любом другом растворе, имеющем сравнимую ионную силу, и при отмывке при комнатной температуре в растворе, содержащем приблизительно 1 М соль, предпочтительно 6 x SSC, или в любом другом растворе, имеющем сравнимую ионную силу. Предпочтительно, гибридизацию проводят в течение ночи, т.е. по меньшей мере, в течение 10 часов, и предпочтительно, промывку проводят в течение по меньшей мере одного часа, по меньшей мере с двумя заменами раствора для промывки. Эти условия обычно позволяют специфическую гибридизацию последовательностей, имеющих вплоть до 50% идентичности последовательности. Специалист в данной области способен модифицировать эти условия гибридизации для специфической идентификации последовательностей, изменчивых по идентичности между 50% и 90%.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится к применению парвовирусов животных, в частности, депендовирусов, таких как инфекционный AAV человека или обезьяны, и их компонентов (например, генома парвовируса животных), для применения в качестве векторов для введения и/или экспрессии нуклеиновых кислот в клетках млекопитающих. В частности, изобретение относится к улучшению инфекционности таких парвовирусных векторов при продукции в клетках насекомых.

Вирусы семейства Parvoviridae представляют собой небольшие ДНК-вирусы животных. Parvoviridae может быть разделено на два подсемейства: Parvovirinae, инфицирующее позвоночных, и Densovirinae, инфицирующее насекомых. Члены подсемейства Parvovirinae обозначены в настоящем описании как парвовирусы и включают род Dependovirus. Как можно понять из названия этого рода, члены Dependovirus являются уникальными в том смысле, что им обычно необходима совместная инфекция вирусом-помощником, таким как аденовирус или вирус герпеса, для продуктивной инфекции в культуре клеток. Род Dependovirus включает AAV, который обычно инфицирует людей (например, серотипы 1, 2, 3A, 3B, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13)

или приматов (например, серотипы 1 и 4), и родственные вирусы, которые инфицируют других теплокровных животных (например, бычий, собачий, лошадиный и овечий аденоассоциированные вирусы). Дополнительная информация по парвовирусам и другим членам Parvoviridae описана в Kenneth I. Berns, «Parvoviridae: The Viruses and Their Replication», Chapter 69 in Fields Virology (3d Ed. 1996). Для удобства, настоящее изобретение далее проиллюстрировано и описано в настоящем описании применительно к AAV. Однако понятно, что изобретение не является ограниченным AAV, но может быть равным образом применимо к другим парвовирусам.

Геномная организация всех известных серотипов AAV очень сходна. Геном AAV представляет собой линейную одноцепочечную молекулу ДНК, имеющую длину менее чем приблизительно 5000 нуклеотидов (н.). Инвертированные концевые повторы (ITR) фланкируют уникальные кодирующие нуклеотидные последовательности для неструктурных белков репликации (Rep) и структурных белков (VP). Белки VP (VP1, -2 и -3) формируют капсид. Концевые 145 н. являются самокомплементарными и организованы таким образом, что может быть сформирован энергетически стабильный внутримолекулярный дуплекс, образующий Т-образную шпильку. Эти шпильчатые структуры функционируют как точки начала репликации ДНК вируса, выступая в качестве праймеров для клеточного комплекса ДНК-полимеразы. После инфекции клеток млекопитающих wtAAV, гены Rep (т.е. Rep78 и Rep52) экспрессируются с промотора P5 и промотора P19, соответственно, и оба белка Rep выполняют определенную функцию в репликации генома вируса. Событие сплайсинга в ORF Rep приводит к экспрессии фактически четырех белков Rep (т.е. Rep78, Rep68, Rep52 и Rep40). Однако показано, что несплайсированная мРНК, кодирующая белки Rep78 и Rep52, является достаточной для продукции вектора AAV в клетках млекопитающих. Также в клетках насекомых белки Rep78 и Rep52 являются достаточными для продукции вектора AAV. Три капсидных белка, VP1, VP2 и VP3, экспрессируются с одной рамки считывания VP с промотора p40. Инфекция wtAAV клеток млекопитающих для продукции капсидных белков зависит от комбинации альтернативного использования двух акцепторных участков сплайсинга и субоптимального использования иницирующего кодона ACG для VP2.

В клетках насекомых, экспрессия транскрипта, т.е. мРНК, с использованием открытой рамки считывания AAV, кодирующей белки VP1 (с иницирующим кодоном AUG), VP2 и VP3, в норме не образует капсидные белки VP1, VP2 и VP3 в соотношении приблизительно 1:1:10 и в количестве, приводящем к активному AAV. Активность определяют в настоящем описании как способность вектора AAV переносить геном вектора в клетку-мишень и обеспечивать эффективную экспрессию трансгена. Авторы настоящего изобретения в настоящее время неожиданно обнаружили, что капсиды AAV можно высокоэффективно получать в клетках насекомых из экспрессирующей конструкции, кодирующей транскрипт для белков VP1, VP2 и VP3, где VP1 транслируется с иницирующего кодона AUG.

Экспрессирующие конструкции, идентифицированные по настоящему

изобретению, позволяют эффективную продукцию в клетках насекомых хороших количеств высокоактивных генотерапевтических векторов AAV для использования в медицинском лечении. Такие векторы являются по меньшей мере сходными, если не улучшенными, применительно к активности, по сравнению с генотерапевтическими векторами AAV, продуцированными с альтернативных иницирующих кодонов, таких как CTG или GTG (фигура 4). Понятно, что применительно к последовательностям нуклеиновой кислоты, их можно перечислять либо как последовательность ДНК, перечисляя А, Т, С и G, либо как последовательность РНК, перечисляя А, U, С и G. Понятно, что экспрессирующая конструкция обычно может относиться к последовательностям ДНК, в то время как экспрессированные нуклеотидные последовательности относятся к последовательностям РНК, т.е., мРНК, которая транскрибирована или экспрессирована с экспрессирующей конструкции.

Конструкции по изобретению кодируют дополнительный иницирующий кодон вне рамки на 5' от иницирующего кодона VP1, что, по-видимому, приводит к уменьшению инициации трансляции на иницирующем кодоне VP1, позволяя дальнейшую трансляцию достаточных количеств как VP2, так и VP3. Без связи с теорией, такой 5'-иницирующий кодон вне рамки приводит к созданию помех для инициации транскрипции на иницирующем кодоне AUG VP1 и позволяет рибосомное сканирование с псевдоподтеканием, сходное с тем, что происходит в AAV дикого типа. Без связи с теорией, синтез коротких пептидов (например, терминация трансляции перекрывающейся вне рамки рамки считывания до кодирующей последовательности VP2) с этих альтернативных иницирующих кодонов может позволять рибосоме продолжать сканирование ниже иницирующего кодона AUG VP1 или вызывать его повторную инициацию, позволяя трансляцию VP2 и VP3 с того же самого транскрипта.

Такие конструкции обеспечивают по меньшей мере сходную, если не улучшенную, продукцию капсидов AAV в клетках насекомых, с хорошей активностью, по сравнению с капсидами AAV, полученными на предшествующем уровне техники. Преимущественно, такие конструкции могут позволять нуклеотидным последовательностям для VP1, VP2 и VP3, как они обнаружены в вирусе дикого типа, являться немодифицированными при использовании для получения экспрессирующих конструкций для клеток насекомых. Конструкции по изобретению могут позволять аминокислотным последовательностям капсидных белков VP1, VP2 и VP3 являться в основном идентичными капсидным белкам, обнаруженным в вирусе дикого типа, или являться идентичными им. Этот способ экспрессии является, таким образом, применимым, как правило, к любой конструкции парвовирусного вектора или вектора AAV и может не требовать никакого дополнительного приспособления 5'-последовательностей или последовательностей открытых рамок считывания капсида AAV.

Таким образом, в первом аспекте, настоящее изобретение относится к конструкции нуклеиновой кислоты, содержащей последовательности для контроля экспрессии, для экспрессии в клетке насекомого нуклеотидной последовательности, содержащей

открытую рамку считывания, где последовательность открытой рамки считывания кодирует:

- i) капсидные белки VP1, VP2 и VP3 аденоассоциированного вируса (AAV); и
- ii) иницирующий трансляцию кодон ATG для VP1;

где указанная нуклеотидная последовательность содержит, выше открытой рамки считывания, альтернативный иницирующий кодон, находящийся вне рамки применительно к открытой рамке считывания.

Понятно, что экспрессия нуклеотидной последовательности по изобретению относится к мРНК, которая экспрессируется. Таким образом, альтернативный иницирующий кодон должен содержаться в мРНК, т.е. он содержится в последовательности на 5' от открытой рамки считывания, кодирующей капсидные белки, и находится на 3' от участка инициации транскрипции конструкции нуклеиновой кислоты. Указанная альтернативная рамка считывания, находится, таким образом, на 5' от кодона AUG VP1, какой содержится в экспрессированной мРНК. Понятно, что под открытой рамкой считывания по изобретению понимают одну открытую рамку считывания, т.е., последовательности, кодирующие капсидные белки VP1, VP2 и VP3, перекрываются. Иными словами, белки VP2 и VP3 кодированы той же последовательностью, что и последовательность VP1. Такая открытая рамка считывания может представлять собой непрерывную открытую рамку считывания, но может также не являться непрерывной, например, являться содержащей интронную последовательность. Предпочтительно, указанная открытая рамка считывания, с которой транслируются VP1, VP2 и VP3, представляет собой непрерывную одиночную открытую рамку считывания, где никаких дополнительных транскриптов не транскрибируется у насекомого, в котором можно транслировать капсидные белки (например, когда один транскрипт кодирует VP1, и другой транскрипт кодирует VP2, и еще дополнительный транскрипт кодирует VP3).

Указанный иницирующий кодон вне рамки предпочтительно выбран из группы, состоящей из CUG, ACG, AUG, UUG, CUC и CUU. Более предпочтительно, альтернативный иницирующий кодон выбран из AUG или CUG. Наиболее предпочтительно, указанный альтернативный иницирующий кодон представляет собой AUG. Как показано в разделе примеры, последовательности, имеющие иницирующий кодон AUG, которые являлись наиболее преобладающими, по большей части содержали иницирующий кодон вне рамки. По большей части, вышележащий иницирующий кодон вне рамки представляет собой относительно сильный кодон, такой как UUG, CUG, GUG, AUG и ACG. Наблюдали также более слабые иницирующие кодоны, такие как CUC и CUU. Наиболее преобладающим и наиболее предпочтительным является AUG, в качестве альтернативного иницирующего кодона вне рамки.

Альтернативный иницирующий кодон может представлять собой старт альтернативной открытой рамки считывания. Таким образом, альтернативный иницирующий кодон понимают как содержащий кодон, с которого рибосома может иницировать трансляцию. Иногда, когда иницирующий кодон находится, например,

близко к 5'-кэпированному концу мРНК, такой последовательности могут не позволять функционировать в качестве иницирующего кодона. Понятно, что из-за генетического кода, где триплет кодирует аминокислоту, последовательность нуклеиновой кислоты можно транслировать в три различные аминокислотные последовательности, в зависимости от того, где происходит инициация и терминация трансляции. Альтернативные иницирующие кодоны вне рамки находятся выше иницирующего кодона AUG VP1 и предпочтительно, генетический код, следующий за альтернативным иницирующим кодоном, является таким, что терминация трансляции происходит таким образом, что рибосома не иницирует, или затрудняется иницировать, трансляцию с иницирующего кодона AUG VP1. Подобным образом, без связи с теорией, альтернативные иницирующие кодоны вне рамки выше иницирующего кодона AUG VP1 позволяют инициацию трансляции с мРНК. Предпочтительно, терминация альтернативной открытой рамки считывания происходит ниже иницирующего кодона AUG VP1. Например, когда за иницирующим кодоном AUG VP1 непосредственно следует А, триплет UGA в последовательности AUGA кодирует терминирующий кодон. Таким образом, предпочтительно, альтернативная открытая рамка считывания, начинающаяся на вышележащем альтернативном иницирующем кодоне, включает иницирующий кодон AUG VP1.

Таким образом, в следующем варианте осуществления, настоящее изобретение относится к конструкции нуклеиновой кислоты для экспрессии в клетке насекомого нуклеотидной последовательности, содержащей открытую рамку считывания, где последовательность открытой рамки считывания кодирует капсидные белки VP1, VP2 и VP3 аденоассоциированного вируса (AAV), и иницирующий трансляцию кодон AUG VP1, где указанная нуклеотидная последовательность содержит альтернативную открытую рамку считывания, начинающуюся с альтернативного иницирующего кодона, где альтернативная открытая рамка считывания включает указанный иницирующий трансляцию кодон AUG для VP1.

Альтернативная открытая рамка считывания начинается, предпочтительно, самое большее за 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 или 10 нуклеотидов на 5' от иницирующего кодона AUG VP1 и подвергается терминации после него. Альтернативная открытая рамка считывания начинается на 5' от иницирующего кодона AUG VP1 и подвергается терминации самое большее через 500, 400, 300, 200, 150, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 или 10 нуклеотидов после него. Альтернативная открытая рамка считывания может начинаться, самое большее за 50 нуклеотидов на 5' от иницирующего кодона AUG VP1 и подвергается терминации самое большее через 500 нуклеотидов после него. Альтернативная открытая рамка считывания может начинаться, самое большее, за 40 нуклеотидов на 5' от иницирующего кодона AUG VP1 и подвергается терминации самое большее через 200 нуклеотидов после него. Альтернативная открытая рамка считывания может также начинаться, самое большее за 30 нуклеотидов на 5' от иницирующего кодона AUG VP1 и подвергается терминации самое большее через 50 нуклеотиды после

него. Альтернативная открытая рамка считывания может начинаться, самое большее за 10 нуклеотидов от иницирующего кодона AUG VP1 и подвергается терминации самое большее через 20 нуклеотиды после него. В одном альтернативном варианте осуществления, указанная альтернативная открытая рамка считывания подвергается терминации до иницирующего кодона VP3, предпочтительно до иницирующего кодона VP2. Например, такие альтернативные открытые рамки считывания, показанные в примерах, начинаются на 4 нуклеотида выше и подвергаются терминации через 14 нуклеотидов после него, или начинаются на 8 нуклеотидов выше и подвергаются терминации через 4 или более нуклеотидов после него.

Такие альтернативные открытые рамки считывания могут, предпочтительно, содержаться в последовательности ДНК, кодирующей капсидные белки VP1, VP2 и VP3 аденоассоциированного вируса (AAV), содержащей, выше последовательности иницирующего кодона ATG VP1, последовательность, кодированную нуклеотидами 105-155 из последовательности ДНК из SEQ ID NO:70. Указанная последовательность выше иницирующего кодона ATG транскрибируется в РНК. Такие альтернативные открытые рамки считывания могут также содержаться в последовательности ДНК, кодирующей капсидные белки VP1, VP2 и VP3 аденоассоциированного вируса (AAV), содержащей, выше последовательности иницирующего кодона ATG VP1, последовательность, кодированную нуклеотидами 1-155 из последовательности ДНК из SEQ ID NO:70. Такая вышележащая последовательность кодирует промотор полиэдрина и 5'-лидерную последовательность выше иницирующего кодона ATG VP1 (105-155).

Таким образом, предпочтительно, альтернативные открытые рамки считывания по изобретению, как описано выше, транслируются в пептид в клетках насекомых. В одном варианте осуществления, указанный пептид имеет длину по меньшей мере 4 аминокислоты, по меньшей мере 5 аминокислот, по меньшей мере 6 аминокислот. В одном варианте осуществления, транслированная аминокислотная последовательность содержит или состоит из SEQ ID NO:72 или SEQ ID NO:73. В другом варианте осуществления, указанный пептид имеет длину самое большее 200, 150, 100, 50, 40, 30, 20 или 10 аминокислот. В следующем варианте осуществления, конструкции нуклеиновой кислоты по изобретению, кодирующие указанные альтернативные открытые рамки считывания, транслируются в пептиды с длиной в диапазоне от 2 до 200 аминокислот, от 2 до 100, от 2 до 50 или, предпочтительно, от 2 до 10. Таким образом, конструкция нуклеиновой кислоты по изобретению, как описано в настоящем описании, содержащая указанную альтернативную открытую рамку считывания после альтернативного иницирующего кодона, кодирует пептид. Длина пептида может зависеть от последовательности после иницирующего кодона VP1, т.е. последовательности, кодирующей VP1, которая может происходить, например, из последовательности AAV, выделенной из природных источников, или из синтетической или искусственной последовательности капсида AAV (например, оптимизированного по кодонному составу или мутантного варианта с улучшенными свойствами). Таким образом, длина зависит от

того, где стоп-кодон (TGA, TAA, TAG) встречается в находящейся вне рамки считывания, начинающейся с альтернативного иницирующего кодона выше иницирующего кодона ATG VP1. Последовательность ниже иницирующего кодона можно подвергать мутагенезу для введения стоп-кодона, который находится в рамке с вышележащим иницирующим кодоном вне рамки. Таким образом, длину пептида можно специально выбирать. Таким образом, можно вводить стоп-кодон вне рамки, который, применительно к кодирующей последовательности VP1, не вносит изменений в аминокислотную последовательность, иными словами, представляет собой молчащую мутацию в рамке считывания VP1. Введенный вне рамки считывания стоп-кодон можно вводить посредством одной, двух или трех точечных мутаций в трех последовательных нуклеиновых кислотах в рамке считывания. Можно вставлять также в кодирующую последовательность VP1 последовательность триплета (т.е. TGA, TAA или TAG), которая может приводить к вставке одной аминокислоты, применительно к длине кодирующей последовательности, и приводить к дополнительной аминокислотной замене в кодирующей последовательности VP1 (т.е. один триплет из кодирующей последовательности VP1 заменяют на два триплета посредством вставки стопа-кодона вне рамки).

В другом варианте осуществления, настоящее изобретение относится к конструкции нуклеиновой кислоты, содержащей последовательности для контроля экспрессии, для экспрессии в клетке насекомого нуклеотидной последовательности, содержащей открытую рамку считывания, где последовательность открытой рамки считывания кодирует:

- i) капсидные белки VP1, VP2 и VP3 аденоассоциированного вируса (AAV); и
- ii) иницирующий трансляцию кодон AUG для VP1;

где указанная нуклеотидная последовательность содержит, непосредственно выше AUG VP1, нуклеотиды 1-8 из нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO. 32-62. Понятно, что SEQ ID NO. 32-62 относятся к последовательности РНК, таким образом, конструкции нуклеиновой кислоты могут иметь соответствующие последовательности ДНК, кодирующие указанные последовательности РНК, такие как перечислено в SEQ ID NO. 1-31. Предпочтительно, указанные нуклеотидные последовательности содержат, непосредственно ниже AUG VP1, нуклеотид G. Более предпочтительно, конструкции нуклеиновой кислоты по изобретению, содержат последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO. 1-31, кодирующую иницирующий кодон VP1, где указанный иницирующий кодон VP1 соответствует положению 9-11 из указанных SEQ ID NO. 1-31. Наиболее предпочтительными являются последовательности, происходящие из SEQ ID NO.1 и SEQ ID NO.32, т.е., предпочтительно, нуклеотиды 1-8 из них, имеющие, предпочтительно, G, непосредственно прилегающий к ATG VP1, наиболее предпочтительно, кодирующие целую последовательность из SEQ ID NO.1.

В следующем варианте осуществления, настоящее изобретение относится к

конструкции нуклеиновой кислоты, где второй кодон открытой рамки считывания VP1 кодирует аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из аланина, глицина, валина, аспарагиновой кислоты и глутаминовой кислоты. Этот второй аминокислотный остаток может происходить из кодона, вставленного между иницирующим кодоном и вторым кодоном, происходящим, например, из последовательности VP1 AAV дикого типа, или второй кодон из нуклеотидной последовательности VP1 может представлять собой подвергнутый мутагенезу кодон (например, посредством мутагенеза нуклеиновой кислоты непосредственно после кодона ATG VP1 в G). Наиболее предпочтительно, второй кодон VP1 кодирует валин. Более предпочтительно, второй кодон выбран из группы, состоящей из GUA, GUC, GUU, GUG, предпочтительно, второй кодон представляет собой GUA. Открытая рамка считывания, необязательно, содержит один или несколько кодонов, кодирующих дальнейшие дополнительные аминокислотные остатки после второго кодона, например, кодоны для 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 дополнительных аминокислот, но предпочтительно, менее чем 60, 50, 40, 35, 30, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15 или 14 дополнительных аминокислотных остатков. Как хорошо понятно, кодоны, кодирующие дополнительные аминокислотные остатки, должны находиться в рамке с открытой рамкой считывания капсидных белков.

Таким образом, в одном варианте осуществления, настоящее изобретение относится к вектору AAV, содержащему капсидный белок VP1, имеющий валин в положении 2 VP1, либо из-за модификации положения 2, например, белковой последовательности капсида VP1 дикого типа, либо из-за вставки кодона валина между положением 1 и положением 2 белковой последовательности капсида VP1 дикого типа, либо из-за того, что капсидный белок VP1, как обнаружено в природе, или как отобрано, уже содержит валин в положении 2. Такой капсид, как предпочтительно получено в клетках насекомых, может являться особенно применимым в медицинском лечении, как описано в настоящем описании.

В одном варианте осуществления, если открытую рамку считывания сравнивают с капсидным белком дикого типа, открытая рамка считывания, кодирующая капсидные белки, дополнительно содержит кодоны, кодирующие один или несколько аминокислотных остатков, вставленных между иницирующим трансляцию кодоном ATG VP1 и кодоном, кодирующим аминокислотный остаток, непосредственно смежный с иницирующим кодоном на его 3'-конце в соответствующем капсидном белке дикого типа. Например, открытая рамка считывания содержит кодоны для 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 дополнительных аминокислотных остатков, по сравнению с соответствующим капсидным белком дикого типа. Предпочтительно, открытая рамка считывания содержит кодоны для менее чем 60, 50, 40, 35, 30, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15 или 14 дополнительных аминокислотных остатков, по сравнению с соответствующим капсидным белком дикого типа. Как хорошо понятно, кодоны, кодирующие дополнительные аминокислотные остатки, должны находиться в рамке с

открытой рамкой считывания капсидных белков. Из этих кодонов, которые кодируют дополнительные аминокислотные остатки, по сравнению с соответствующими капсидными белками дикого типа, первый кодон, т.е. кодон, который является непосредственно смежным с субоптимальным иницирующим трансляцию кодоном на его 3'-конце, кодирует аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из аланина, глицина, валина, аспарагиновой кислоты и глутаминовой кислоты. Таким образом, если присутствует только один дополнительный кодон между иницирующим трансляцию кодоном и кодоном, кодирующим аминокислотный остаток, соответствующий остатку 2 из последовательности дикого типа, этот дополнительный кодон кодирует аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из аланина, глицина, валина, аспарагиновой кислоты и глутаминовой кислоты. Если присутствует более одного дополнительного кодона между иницирующим трансляцию кодоном и кодоном, кодирующим аминокислотный остаток 2 из последовательности дикого типа, тогда кодон непосредственно после иницирующего трансляцию кодона кодирует аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из аланина, глицина, валина, аспарагиновой кислоты и глутаминовой кислоты. Предпочтительно, дополнительный аминокислотный остаток непосредственно после субоптимального иницирующего трансляцию кодона (т.е., на его 3'-конце) представляет собой валин. Иными словами, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, кодон непосредственно после субоптимального иницирующего трансляцию кодона кодирует валин.

Последовательность, кодирующая капсидные белки AAV на стадии а), может представлять собой последовательность капсида, как обнаружено в природе, например, такого как AAV1 - AAV13, нуклеотидные и аминокислотные последовательности которых перечислены в Lubelski et al. WO2015137802 как SEQ ID NO: 13-38, полное содержание которой приведено в настоящем описании в качестве ссылки. Таким образом, конструкция нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению может содержать полную открытую рамку считывания для капсидных белков AAV, как описано в Lubelski et al. WO2015137802. Альтернативно, последовательность может являться рукотворной, например, последовательность может представлять собой гибридную форму или может являться оптимизированной по кодонному составу, например, по использованию кодонов в *AcmNPv* или *Spodoptera frugiperda*. Например, последовательность капсида может состоять из последовательностей VP2 и VP3 AAV1, в то время как оставшаяся последовательность VP1 происходит из AAV5. Предпочтительный капсидный белок представляет собой AAV5, предпочтительно, как представлено в SEQ ID NO: 22 или AAV8, предпочтительно, как представлено в SEQ ID NO: 28, как перечислено в Lubelski et al. WO2015137802. Таким образом, в предпочтительном варианте осуществления, капсидные белки AAV представляют собой капсидные белки AAV серотипа 5 или AAV серотипа 8, модифицированные по изобретению. Более предпочтительно, капсидные белки AAV представляют собой капсидные белки AAV серотипа 5, модифицированные по

изобретению. Понятно, что точные молекулярные массы капсидных белков, так же как точные положения иницирующих трансляцию кодонов, могут отличаться между различными парвовирусами. Однако, специалисту в данной области известно, каким образом идентифицировать соответствующее положение в нуклеотидной последовательности из парвовирусов, отличных от AAV-5. Альтернативно, последовательность, кодирующая капсидные белки AAV, представляет собой рукотворную последовательность, например, полученную в результате экспериментов по направленной эволюции. Они могут включать получение библиотеки капсидов посредством перетасовки ДНК, ПЦР пониженной точности, биоинформатического рационального дизайна, сайт-насыщающего мутагенеза. Полученные капсиды основаны на существующих серотипах, но содержат различные замены аминокислот или нуклеотидов, улучшающие признаки таких капсидов. Полученные капсиды могут представлять собой комбинацию различных частей из существующих серотипов, «перетасованные капсиды», или могут содержать полностью новые изменения, т.е. добавления, делеции или замены одного или нескольких из аминокислот или нуклеотидов, организованные в группы или распределенные на протяжении полной длины гена или белка. См., например, Schaffer and Maheshri; Proceedings of the 26th Annual International Conference of the IEEE EMBS San Francisco, CA, USA; September 1-5, 2004, pages 3520-3523; Asuri et al. (2012) *Molecular Therapy* 20(2):329-3389; Lisowski et al. (2014) *Nature* 506(7488):382-386, содержание которых приведено в настоящем описании в качестве ссылки.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения, открытая рамка считывания, кодирующая капсидный белок VP3, начинается с неканонического иницирующего трансляцию кодона выбранного из группы, состоящей из: ACG, ATT, ATA, AGA, AGG, AAA, CTG, CTT, CTC, CTA, CGA, CGC, TTG, TAG и GTG. Предпочтительно, неканонический иницирующий трансляцию кодон выбран из группы, состоящей из GTG, CTG, ACG, TTG, более предпочтительно, неканонический иницирующий трансляцию кодон представляет собой CTG.

Нуклеотидная последовательность по изобретению для экспрессии капсидных белков AAV, кроме того, предпочтительно содержит по меньшей мере одну модификацию нуклеотидной последовательности, кодирующей капсидный белок VP1 AAV, выбранную среди G в положении нуклеотида 12, A в положении нуклеотида 21 и C в положении нуклеотида 24 открытой рамки считывания VP1, где положения нуклеотидов соответствуют положениям нуклеотидов из нуклеотидных последовательностей дикого типа. «Потенциальный/возможный ложный участок начала» или «потенциальный/возможный ложный иницирующий трансляцию кодон» понимают в настоящем описании как обозначающий находящийся в рамке кодон ATG, локализованный в кодирующей последовательности капсидного белка(белков). Удаление возможных ложных участков начала трансляции в кодирующих последовательностях VP1 из других серотипов хорошо понятно специалисту в данной области, так же как удаление

предположительных участков сплайсинга, которые могут быть узнаваемыми в клетках насекомых. Например, модификация нуклеотида в положении 12 не является необходимой для рекомбинантного AAV5, поскольку нуклеотид Т не вызывает образования ложного кодона ATG. Различные модификации последовательностей AAV дикого типа для соответствующей экспрессии в клетках насекомых получают с использованием хорошо известных способов генной инженерии, таких как, описанные, например, в Sambrook and Russell (2001) «Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd edition), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. Специалисту в данной области известны различные дополнительные модификации кодирующих областей VP, которые могут либо увеличивать выход VP и вириона, либо оказывать другие желательные эффекты, такие как изменение тропизма или уменьшение антигенности вириона. Эти модификации включены в объем настоящего изобретения.

Предпочтительно, нуклеотидная последовательность по изобретению, кодирующая капсидные белки AAV, функционально связана с последовательностями для контроля экспрессии, для экспрессии в клетке насекомого. Таким образом, во втором аспекте, настоящее изобретение относится к конструкции нуклеиновой кислоты, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты по изобретению, где нуклеотидная последовательность открытой рамки считывания, кодирующей капсидные белки аденоассоциированного вируса (AAV), функционально связана с последовательностями для контроля экспрессии, для экспрессии в клетке насекомого. Эти последовательности для контроля экспрессии включают по меньшей мере промотор, который активен в клетках насекомых. Способы, известные специалисту в данной области, для экспрессии чужеродных генов в клетках-хозяевах насекомых, можно использовать в практическом осуществлении настоящего изобретения. Способы молекулярного конструирования и экспрессии полипептидов в клетках насекомых описаны, например, в Summers and Smith. 1986. A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Culture Procedures, Texas Agricultural Experimental Station Bull. No. 7555, College Station, Tex.; Luckow. 1991. In Prokop et al., Cloning and Expression of Heterologous Genes in Insect Cells with Baculovirus Vectors' Recombinant DNA Technology and Applications, 97-152; King, L. A. и R. D. Possee, 1992, The baculovirus expression system, Chapman and Hall, United Kingdom; O'Reilly, D. R., L. K. Miller, V. A. Luckow, 1992, Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual, New York; W. H. Freeman and Richardson, C. D., 1995, Baculovirus Expression Protocols, Methods in Molecular Biology, volume 39; US 4745051; US2003148506; и WO 03/074714. Особенно подходящим промотором для транскрипции нуклеотидной последовательности по изобретению, кодирующей капсидные белки AAV, является например, промотор полиэдрина (polH), такой как промотор polH, представленный в SEQ ID NO:70 (или, как перечислено в SEQ ID NO:53, и его укороченный вариант из SEQ ID NO: 54, в Lubelski et al. WO2015137802). Однако в данной области известны также другие промоторы, которые активны в клетках насекомых и которые можно выбирать по изобретению, например, промотор полиэдрина (polH), промотор p10, промотор p35, 4xHsp27 EcRE+минимальный промотор Hsp70,

промотор deltaE1, промотор E1 или промотор IE-1 и дополнительные промоторы, описанные в вышеупомянутых ссылках. Предпочтительно, конструкция нуклеиновой кислоты для экспрессии капсидных белков AAV в клетках насекомых, представляет собой вектор, совместимый с клеткой насекомого. Под «вектором, совместимым с клеткой насекомого», или «вектором» понимают молекулу нуклеиновой кислоты, способную к продуктивной трансформации или трансфекции насекомого или клетки насекомого. Иллюстративные биологические векторы включают плазмиды, линейные молекулы нуклеиновой кислоты и рекомбинантные вирусы. Можно использовать любой вектор, при условии, что он совместим с клеткой насекомого. Вектор может быть интегрирован в геном клеток насекомых, но присутствие вектора в клетке насекомого необязательно должно быть постоянным, и временные эпиземальные векторы также включены. Векторы можно вводить любыми известными способами, например, посредством химической обработки клеток, электропорации или инфекции. В предпочтительном варианте осуществления, вектор представляет собой бакуловирус, вирусный вектор или плазмиду. В более предпочтительном варианте осуществления, вектор представляет собой бакуловирус, т.е. конструкция представляет собой бакуловирусный вектор. Бакуловирусные векторы и способы их использования описаны в процитированных выше ссылках по молекулярному конструированию клеток насекомых.

В третьем аспекте, настоящее изобретение относится к клетке насекомого, содержащей конструкцию нуклеиновой кислоты по изобретению, как определено выше. Любую клетку насекомого, которая позволяет репликацию AAV, и которую можно поддерживать в культуре, можно использовать по настоящему изобретению. Например, используемая линия клеток может быть получена из *Spodoptera frugiperda*, линий клеток дрозофиллы или линий клеток комара, например, происходящих из *Aedes albopictus* линий клеток. Предпочтительные клетки или линии клеток насекомых представляют собой клетки, полученные из вида насекомого, который является чувствительным к инфекции бакуловирусом, включая, например, expresSF+®, клетки *Drosophila Schneider 2* (S2), Se301, SeIZD2109, SeUCR1, Sf9, Sf900+, Sf21, BTI-TN-5B1-4, MG-1, Tn368, HzAm1, Ha2302, Hz2E5 и High Five от Invitrogen.

Предпочтительная клетка насекомого по изобретению дополнительно содержит: (a) вторую нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность инвертированного концевой повтора (ITR) AAV; (b) третью нуклеотидную последовательность, содержащую кодирующую последовательность Rep52 или Rep40, функционально связанную с последовательностями для контроля экспрессии, для экспрессии в клетке насекомого; и, (c) четвертую нуклеотидную последовательность, содержащую кодирующую последовательность Rep78 или Rep68, функционально связанную с последовательностями для контроля экспрессии, для экспрессии в клетке насекомого.

В контексте изобретения, под «по меньшей мере одной нуклеотидной последовательностью ITR AAV» понимают палиндромную последовательность,

содержащую по большей части комплементарные, симметрично организованные последовательности, также обозначаемые как области «А», «В» и «С». ITR функционирует в качестве точки начала репликации, участка, играющего «цис»-роль в репликации, т.е., является участком узнавания транс-действующих белков репликации (например, Rep 78 или Rep68), которые узнают палиндромные и специфические последовательности внутри палиндрома. Одним исключением в симметрии последовательности ITR является область «D» ITR. Она является уникальной (не имеет комплементарности внутри одного ITR). Введение разрыва в одноцепочечную ДНК происходит на стыке между областями А и D. Он представляет собой область, в котором происходит инициация синтеза новой ДНК. Область D в норме находится на одной стороне палиндрома и определяет направленность нуклеиновой кислоты на стадии репликации. AAV, реплицирующийся в клетке млекопитающего, как правило, имеет две последовательности ITR. Однако возможно сконструировать ITR таким образом, чтобы участки связывания находились на обеих цепях областей А и областей D, локализованные симметрично, по одному на каждой стороне палиндрома. На двухцепочечной кольцевой ДНК-матрице (например, плазмиде), репликация нуклеиновой кислоты с помощью Rep78 или Rep68 затем происходит в обоих направлениях, и одного ITR достаточно для репликации кольцевого вектора AAV. Таким образом, одну нуклеотидную последовательность ITR можно использовать в контексте настоящего изобретения. Предпочтительно, однако, используют два или другое четное количество упорядоченных ITR. Наиболее предпочтительно, используют две последовательности ITR. С точки зрения безопасности вирусных векторов, может являться желательным сконструировать вирусный вектор, который не способен к дальнейшему размножения после исходного введения в клетку. Такой механизм безопасности для ограничения нежелательного размножения вектора у реципиента можно обеспечивать с использованием гAAV с химерным ITR, как описано в US2003148506. В предпочтительном варианте осуществления, нуклеотидная последовательность, кодирующая парвовирусные капсидные белки VP1, VP2 и VP3, содержит по меньшей мере одну находящуюся в рамке вставку последовательности, кодирующей повтор для ускользания от иммунологического надзора, такой, как описано в WO 2009/154452. Это приводит к формированию так называемого самокомплементарного или мономерного дуплексного парвовирусного вириона. В предпочтительном варианте осуществления, последовательность, кодирующая парвовирусные капсидные белки VP1, VP2 и VP3, содержит мономерный дуплексный или самокомплементарный геном. Для получения мономерного дуплексного вектора AAV, белки Rep AAV и капсидные белки AAV экспрессируют в клетках насекомых по настоящему изобретению и в присутствии генома вектора, содержащего по меньшей мере один ITR AAV, где экспрессия белка Rep52 и/или Rep40 увеличена относительно экспрессии белка Rep78 и/или Rep68. Мономерные дуплексные векторы AAV можно получать также посредством экспрессии в клетках насекомых белков Rep AAV и белков Cap AAV в присутствии конструкции генома вектора, фланкированного по меньшей мере

одним ITR AAV, где активность внесения разрывов Rep78 и/или Rep 60 уменьшена относительно активности хеликазы/капсидирования Rep52 и/или Rep 40, например, как описано в WO2011/122950.

Количество используемых векторов или конструкций нуклеиновой кислоты не ограничено по изобретению. Например, один, два, три, четыре, пять, шесть или более векторов можно использовать для продукции AAV в клетках насекомых по настоящему изобретению. Если используют шесть векторов, один вектор кодирует VP1 AAV, другой вектор кодирует VP2 AAV, еще один вектор кодирует VP3 AAV, еще другой вектор кодирует Rep52 или Rep40, в то время как Rep78 или Rep 68 кодирован другим вектором, и последний вектор содержит по меньшей мере один ITR AAV. Дополнительные векторы можно использовать для экспрессии, например, Rep52 и Rep40, и Rep78, и Rep 68. Если используют менее шести векторов, векторы могут содержать различные комбинации по меньшей мере одного ITR AAV и кодирующих последовательностей VP1, VP2, VP3, Rep52/Rep40 и Rep78/Rep68. Предпочтительно, используют два вектора или три вектора, где два вектора являются более предпочтительными, как описано выше. Если используют два вектора, клетка насекомого, предпочтительно, содержит: (а) первую конструкцию нуклеиновой кислоты для экспрессии капсидных белков AAV, как определено выше, дополнительно содержащую третью и четвертую нуклеотидные последовательности, как определено в (b) и (c) выше, где третья нуклеотидная последовательность содержит кодирующую последовательность Rep52 или Rep40, функционально связанную по меньшей мере с одной последовательностью для контроля экспрессии, для экспрессии в клетке насекомого, и четвертая нуклеотидная последовательность содержит кодирующую последовательность Rep78 или Rep68, функционально связанную по меньшей мере с одной последовательностью для контроля экспрессии, для экспрессии в клетке насекомого; и (b) вторую конструкцию нуклеиновой кислоты, содержащую вторую нуклеотидную последовательность, как определено в (a) выше, содержащую по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность ITR AAV. Если используют три вектора, предпочтительно используют такую же конфигурацию, какую использовали для двух векторов, за исключением того, что отдельные векторы используют для экспрессии капсидных белков и для экспрессии белков Rep52, Rep40 Rep78 и Rep68. Последовательности в каждом векторе могут находиться в любом порядке относительно друг друга. Например, если один вектор содержит ITR и ORF, содержащую нуклеотидные последовательности, кодирующие капсидные белки VP, ORF VP может быть локализована в векторе таким образом, что при репликации ДНК между последовательностями ITR, ORF VP может реплицироваться или не реплицироваться. В качестве другого примера, кодирующие последовательности Rep и/или ORF, содержащая нуклеотидные последовательности, кодирующие капсидные белки VP, могут находиться в любом порядке в векторе. Следует понимать, что также вторая, третья и следующие конструкция(конструкции) нуклеиновой кислоты, предпочтительно, находятся в векторах, совместимых с клетками насекомых, предпочтительно, в бакуловирусных векторах, как

описано выше. Альтернативно, в клетке насекомого по изобретению, одна или несколько из первой нуклеотидной последовательности, второй нуклеотидной последовательности, третьей нуклеотидной последовательности и четвертой нуклеотидной последовательности, и, необязательно, дополнительных нуклеотидных последовательностей, могут быть стабильно интегрированы в геном клетки насекомого. Специалисту в данной области известно, каким образом можно стабильно ввести нуклеотидную последовательность в геном насекомого и как идентифицировать клетку, имеющую такую нуклеотидную последовательность в геноме. Встраивание в геном можно осуществлять, например, посредством использования вектора, содержащего нуклеотидные последовательности с высокой гомологией с областями генома насекомого. Использование специфических последовательностей, таких как транспозоны, является другим способом введения нуклеотидной последовательности в геном.

Таким образом, в предпочтительном варианте осуществления, клетка насекомого по изобретению содержит: (а) первую конструкцию нуклеиновой кислоты по изобретению, где первая конструкция нуклеиновой кислоты дополнительно содержит третью и четвертую нуклеотидные последовательности, как определено выше; и, (b) вторую конструкцию нуклеиновой кислоты, содержащую вторую нуклеотидную последовательность, как определено выше, где вторая конструкция нуклеиновой кислоты, предпочтительно, представляет собой вектор, совместимый с клетками насекомых, более предпочтительно, бакуловирусный вектор.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения, вторая нуклеотидная последовательность присутствует в клетках насекомых по изобретению, т.е. последовательность, содержащая по меньшей мере один ITR AAV, дополнительно содержит по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность, кодирующую представляющий интерес продукт гена (предпочтительно, для экспрессии в клетке млекопитающего), где, предпочтительно, по меньшей мере одна нуклеотидная последовательность, кодирующая представляющий интерес продукт гена, встраивается в геном AAV, продуцируемого в клетке насекомого. Предпочтительно, по меньшей мере одна нуклеотидная последовательность, кодирующая представляющий интерес продукт гена, представляет собой последовательность для экспрессии в клетке млекопитающего. Предпочтительно, вторая нуклеотидная последовательность содержит две нуклеотидных последовательности ITR AAV и при этом по меньшей мере одна нуклеотидная последовательность, кодирующая представляющий интерес продукт гена, локализована между двумя нуклеотидными последовательностями ITR AAV. Предпочтительно, нуклеотидная последовательность, кодирующая представляющий интерес продукт гена (для экспрессии в клетке млекопитающего), может встраиваться в геном AAV, продуцируемого в клетке насекомого, если она локализована между двумя регулярными ITR, или локализована с любой стороны от ITR, сконструированного с использованием двух областей D. Таким образом, в предпочтительном варианте осуществления, изобретение относится к клетке насекомого по изобретению, где вторая нуклеотидная

последовательность содержит две нуклеотидных последовательности ITR AAV, и где по меньшей мере одна нуклеотидная последовательность, кодирующая представляющий интерес продукт гена, локализована между двумя нуклеотидными последовательностями ITR AAV.

Как правило, представляющий интерес продукт гена, включая ITR, имеет длину 5000 нуклеотидов (н.) или менее. В другом варианте осуществления, ДНК слишком большого размера, т.е. длиной более 5000 н., можно экспрессировать *in vitro* или *in vivo* с использованием вектора AAV, описанного по настоящему изобретению. Под ДНК слишком большого размера в настоящем описании понимают ДНК, превосходящую максимальный предел упаковки в AAV 5 т.п.о. Таким образом, получение векторов AAV, способных продуцировать рекомбинантные белки, обычно кодируемые более крупными геномами, чем 5,0 т.п.о., также является осуществимым. Например, авторы настоящего изобретения получили векторы rAAV5, содержащие частичные, однонаправленно упакованные фрагменты hFVIII, в клетках насекомых. Общий размер генома вектора охватывал по меньшей мере 5,6 т.п.о., упакованные в две популяции частиц AAV5, содержащих фрагмент FVIII. Показано, что эти варианты векторов AAV5-FVIII управляют экспрессией и секрецией активного FVIII. Это подтверждено *in vitro*, где для вектора AAV, содержащего представляющий интерес продукт гена, кодирующего фактор VIII, после инфекции клеток Huh7 получали в результате продукцию активного белка FVIII. Подобным образом, доставка в хвостовую вену rAAV.FVIII у мышей приводила к продукции активного белка FVIII. Молекулярный анализ продуктов капсидирования недвусмысленно показал, что экспрессирующая FVIII кассета 5,6 т.п.о. была не полностью инкапсидирована в частицу AAV. Без намерения быть связанными какой-либо теорией, авторы настоящего изобретения выдвинули гипотезу, что $+$ и - цепи ДНК выявленных инкапсидированных молекул лишены 5'-концов. Это согласуется с опубликованным ранее однонаправленным (начиная с 3'-конца) механизмом упаковки, действующим в соответствии с «правилом заполнения головки», с пределом 4,7-4,9 т.п.о. (см., например, Wu et al. [2010] *Molecular Therapy* 18(1):80-86; Dong et al. [2010] *Molecular Therapy* 18(1):87-92; Kapranov et al. [2012] *Human Gene Therapy* 23:46-55; и в частности, Lai et al. [2010] *Molecular Therapy* 18(1):75-79. Хотя только приблизительно 5 т.п.о. из полного генома вектора 5,6 т.п.о. было инкапсидировано, вектор являлся активным и приводил к экспрессии активного FVIII. Авторы настоящего изобретения показали, что корректная матрица для продукции FVIII была собрана в клетке-мишени на основе частичной комплементации $+$ и - цепей ДНК с последующим синтезом второй цепи.

Вторая нуклеотидная последовательность, определенная в настоящем описании выше, может, таким образом, содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую по меньшей мере один «представляющий интерес продукт гена» для экспрессии в клетке млекопитающего, локализованную таким образом, что она встраивается в геном AAV, реплицирующийся в клетке насекомого. Любая нуклеотидная последовательность может быть встроена для последующей экспрессии в клетке млекопитающего,

трансфицированной AAV, полученным по настоящему изобретению, при условии, что конструкции остаются в пределах пакующей емкости вириона AAV. Нуклеотидная последовательность может, например, кодировать белок, может экспрессировать средство для РНКи, т.е. молекулу РНК, которая способна к РНК-интерференции, например, такую как кшРНК (короткошпилечная РНК) или миРНК (малая интерферирующая РНК). «миРНК» обозначает малую интерферирующую РНК, которая представляет собой двухцепочечную РНК короткой длины, которая не токсична для клеток млекопитающих (Elbashir et al., 2001, *Nature* 411: 494-98; Caplen et al., 2001, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 9742-47). В предпочтительном варианте осуществления, вторая нуклеотидная последовательность может содержать две нуклеотидные последовательности, и каждая кодирует один представляющий интерес продукт гена для экспрессии в клетке млекопитающего. Каждая из двух нуклеотидных последовательностей, кодирующих интересующий продукт, локализована таким образом, что она встраивается в геном rAAV, реплицирующийся в клетке насекомого.

Продукт, представляющий интерес для экспрессии в клетке млекопитающего, может представлять собой терапевтический продукт гена. Терапевтический продукт гена может представлять собой или молекулу РНК (миРНК), или другой продукт гена который, при экспрессии в клетке-мишени, обеспечивает желательный терапевтический эффект, например, такой как удаление нежелательной активности, например, удаление инфицированной клетки, или комплементация генетического дефекта, например, вызывающего недостаточность ферментной активности. Примеры терапевтических полипептидных продуктов генов включают CFTR, фактор IX, липопротеинлипазу (LPL, предпочтительно, LPL S447X; см. WO 01/00220), аполипопротеин A1, уридиндифосфат-глюкуронозилтрансферазу (UGT), белок, взаимодействующий с регулятором ГТФазы при пигментном ретините (RP-GRIP), цитокины или интерлейкины, подобные, например, IL-10, дистрофин, PBGD, NaGLU, Treg167, Treg289, EPO, IGF, IFN, GDNF, FOXP3, фактор VIII, VEGF, AGXT и инсулин. Альтернативно или дополнительно, в качестве второго продукта гена, вторая нуклеотидная последовательность, определенная в настоящем описании выше, может содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, который служит в качестве маркерного белка для оценки трансформации и экспрессии в клетке. Подходящими маркерными белками для этой цели являются, например, флуоресцентный белок GFP и гены селективных маркеров тимидинкиназы HSV (для отбора на среде HAT), бактериальной гигромицин-В-фосфотрансферазы (для отбора на гигромицине В), аминогликозидфосфотрансферазы Tn5 (для отбора на G418) и дигидрофолатредуктазы (DHFR) (для отбора на метотрексате), CD20, ген низкоаффинного рецептора фактора роста нервов. Источники получения указанных маркерных генов и способы их использования описаны в Sambrook and Russel (2001) «Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd edition), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. Кроме того, вторая нуклеотидная последовательность, определенная в настоящем описании выше, может содержать нуклеотидную

последовательность, кодирующую полипептид, который может служить механизмом страховки от ошибок, позволяющим освобождать субъекта от клеток, трансдуцированных rAAV по изобретению, если это представляется необходимым. Такая нуклеотидная последовательность, часто называемая геном самоубийства, кодирует белок, способный переводить пролекарство в токсическое вещество, которое может уничтожать трансгенные клетки, в которых экспрессируется белок. Подходящие примеры таких генов самоубийства включают, например, ген цитозиндезаминазы из *E.coli* или один из генов тимидинкиназы из вируса простого герпеса, цитомегаловируса и вируса ветряной оспы, в этом случае ганцикловир можно использовать в качестве пролекарства для уничтожения трансгенных клеток у субъекта (см., например, Clair et al., 1987, *Antimicrob. Agents Chemother.* 31: 844-849).

В другом варианте осуществления, представляющий интерес продукт гена может представлять собой белок AAV. В частности, он может представлять собой белок Rep, такой как Rep78 или Rep68, или его функциональный фрагмент. Нуклеотидная последовательность, кодирующая Rep78 и/или Rep68, если присутствует в геноме rAAV по изобретению и экспрессируется в клетке млекопитающего, трансдуцированной rAAV по изобретению, позволяет интеграцию rAAV в геном трансдуцированной клетки млекопитающего. Экспрессия Rep78 и/или Rep68 в трансдуцированной или инфицированной rAAV клетке млекопитающего может обеспечивать преимущества для определенных применений rAAV, посредством обеспечения долгосрочной или постоянной экспрессии любого другого представляющего интерес продукта гена, введенного в клетку посредством rAAV.

В векторах rAAV по изобретению по меньшей мере одна нуклеотидная последовательность(последовательности), кодирующая представляющий интерес продукт гена для экспрессии в клетке млекопитающего, предпочтительно, функционально связана/связаны по меньшей мере с одной последовательностью для контроля экспрессии, совместимой с клеткой млекопитающего, например, с промотором. Множество таких промоторов известно в данной области (см. Sambrook and Russel, 2001, выше). Можно использовать конститутивные промоторы, широко осуществляющие экспрессию во многих типах клеток, такие как промотор CMV. Однако более предпочтительными являются промоторы, которые являются индуцируемыми, ткнеспецифическими, специфическими для типа клеток или специфическими для клеточного цикла. Например, для специфической для печени экспрессии, промотор может быть выбран из промотора α 1-анти-трипсина, промотора глобулина, связывающего гормон щитовидной железы, промотора альбумина, промотора LPS (связывающего тироксин глобулина), гибридного промотора HCR-ApoCII, гибридного промотора HCR-hAAT и промотора аполипопротеина E, LP1, HLP, минимального промотора TTR, промотора FVIII, энхансера гиперона, ealb-hAAT. Другие примеры включают промотор E2F для избирательной для опухолей, и, в частности, избирательной для опухолей неврологических клеток экспрессии (Parr et al., 1997, *Nat. Med.* 3:1145-9) или промотор IL-2 для использования в

моноклеарных клетках крови (Hagenbaugh et al., 1997, *J Exp Med*; 185: 2101-10).

AAV способен инфицировать ряд клеток млекопитающих. См., например, Tratschin et al., *Mol. Cell Biol.*, 5(11):3251-3260 (1985) и Grimm et al., *Hum. Gene Ther.*, 10(15):2445-2450 (1999). Однако трансдукция AAV в синовиальные фибробласты человека происходит значительно более эффективно, чем в аналогичные мышечные клетки, Jennings et al., *Arthritis Res*, 3:1 (2001), и клеточный тропизм AAV отличается среди серотипов. См., например, Davidson et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97(7):3428-3432 (2000) (где обсуждают различия между AAV2, AAV4 и AAV5, применительно к их тропизму к клеткам ЦНС млекопитающих и эффективности трансдукции).

Как указано, последовательности AAV, которые можно использовать по настоящему изобретению для продукции AAV в клетках насекомых, могут происходить из генома AAV любого серотипа. В основном, серотипы AAV имеют геномные последовательности с значительной гомологией на уровне аминокислот и нуклеиновых кислот, обеспечивая идентичный набор генетических функций, продукцию вирионов, которые являются по существу физически и функционально эквивалентными, и подвергаются репликации и сборке посредством практически идентичных механизмов. Геномные последовательности различных серотипов AAV и обзор геномного сходства см., например, в номере доступа в GenBank U89790; номере доступа в GenBank J01901; номере доступа в GenBank AF043303; номере доступа в GenBank AF085716; Chlorini et al. (1997, *J. Vir.* 71: 6823-33); Srivastava et al. (1983, *J. Vir.* 45:555-64); Chlorini et al. (1999, *J. Vir.* 73:1309-1319); Rutledge et al. (1998, *J. Vir.* 72:309-319); и Wu et al. (2000, *J. Vir.* 74: 8635-47). Серотипы аденоассоциированного вируса (AAV) человека или обезьяны являются предпочтительными источниками нуклеотидных последовательностей AAV для использования в контексте настоящего изобретения, более предпочтительно, серотипы AAV, которые обычно инфицируют людей (например, серотипы 1, 2, 3A, 3B, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 и 13) или приматов (например, серотипы 1 и 4).

Предпочтительно, последовательности ITR AAV для использования в контексте настоящего изобретения происходят из AAV1, AAV2, AAV5 и/или AAV4. Подобным образом, кодирующие последовательности Rep52, Rep40, Rep78 и/или Rep68 предпочтительно происходят из AAV1, AAV2 и/или AAV4. Последовательности, кодирующие капсидные белки VP1, VP2 и VP3, для использования в контексте настоящего изобретения, можно получать из любого из 42 известных серотипов, более предпочтительно, из AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8 или AAV9, или из новых сконструированных AAV-подобных частиц, полученных, например, посредством способов перетасовки капсидов и библиотек капсидов AAV. В предпочтительном варианте осуществления, последовательности, кодирующие капсидные белки VP1, VP2 и VP3, происходят из AAV5 или AAV8, более предпочтительно, из AAV5.

Последовательности Rep и ITR AAV являются особенно консервативными среди большинства серотипов. Белки Rep78 из различных серотипов AAV являются, например, более чем на 89% идентичными, и суммарная идентичность нуклеотидных

последовательностей на уровне генома между AAV2, AAV3A, AAV3B и AAV6 составляет приблизительно 82% (Bantel-Schaal et al., 1999, J. Virol., 73(2):939-947). Кроме того, известно, что последовательности Rep и ITR многих серотипов AAV подвергаются эффективной перекрестной комплементации (т.е., функциональному замещению) с соответствующими последовательностями из других серотипов при продукции частиц AAV в клетках млекопитающих. В US2003148506 опубликовано, что последовательности Rep и ITR AAV также эффективно подвергаются перекрестной комплементации с другими последовательностями Rep и ITR AAV в клетках насекомых.

Известно, что белки VP AAV определяют клеточный тропизм вириона AAV. Последовательности, кодирующие белки VP, являются значительно менее консервативными, чем белки и гены Rep, среди различных серотипов AAV. Способность последовательностей Rep и ITR к перекрестной комплементации с соответствующими последовательностями из других серотипов позволяет продукцию псевдотипных частиц AAV, содержащих капсидные белки определенного серотипа (например, AAV3) и последовательности Rep и/или ITR из другого серотипа AAV (например, AAV2). Такие псевдотипные частицы AAV составляют часть настоящего изобретения.

Как указано, модифицированные последовательности «AAV» также можно использовать в контексте настоящего изобретения, например, для продукции векторов rAAV в клетках насекомых. Такие модифицированные последовательности например, включающие последовательности, имеющие по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95% или более идентичности нуклеотидных и/или аминокислотных последовательностей (например, последовательность, имеющую приблизительно 75-99% идентичности нуклеотидной последовательности) с AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8 или AAV9 ITR, Rep или VP, можно использовать вместо последовательностей ITR, Rep или VP AAV дикого типа.

Несмотря на сходство с другими серотипами AAV во многих отношениях, AAV5 отличается от других серотипов AAV человека и обезьяны больше, чем другие известные серотипы человека и обезьяны. С учетом этого, продукция AAV5 может отличаться от продукции других серотипов в клетках насекомых. Если способы по настоящему изобретению используют для получения rAAV5, является предпочтительным, чтобы один или несколько векторов включали, совместно, в случае более чем одного вектора, нуклеотидную последовательность, содержащую ITR AAV5, нуклеотидную последовательность, содержащую кодирующую последовательность Rep52 и/или Rep40 AAV5, и нуклеотидную последовательность, содержащую кодирующую последовательность Rep78 и/или Rep68 AAV5. Такие последовательности ITR и Rep можно модифицировать, как желательно, для получения эффективной продукции rAAV5 или псевдотипных векторов rAAV5 в клетках насекомых. Например, можно модифицировать иницирующий кодон последовательностей Rep.

В предпочтительном варианте осуществления, первая нуклеотидная последовательность, вторая нуклеотидная последовательность, третья нуклеотидная последовательность и, необязательно, четвертая нуклеотидная последовательность являются стабильно интегрированными в геном клетки насекомого.

Предпочтительный AAV по изобретению представляет собой вирион, содержащий в геноме по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность, кодирующую представляющий интерес продукт гена, где по меньшей мере одна нуклеотидная последовательность, предпочтительно, не является нативной нуклеотидной последовательностью AAV, и где вирион AAV содержит капсидный белок VP1, содержащий метионин в положении аминокислоты 1 и валин в положении 2. Даже более предпочтительным является вирион AAV, который можно получать из клетки насекомого, как определено выше, например, способом, как определено в настоящем описании ниже.

Преимуществом вирионов AAV по изобретению является их улучшенная инфекционность. Без намерения быть связанными какой-либо теорией, по-видимому, инфекционность увеличивается с увеличением количества белка VP1 в капсиде по отношению к количествам VP2 и/или VP3 в капсиде, в комбинации с валином в положении 2 VP1. Инфекционность вириона AAV понимают в настоящем описании как обозначающую эффективность трансдукции трансгена, содержащегося в вирионе, как можно вывести из частоты экспрессии трансгена и количества или активности продукта, экспрессированного с трансгена.

Предпочтительно, вирион AAV по изобретению содержит представляющий интерес продукт гена, который кодирует полипептидный продукт гена, выбранный из группы, состоящей из: CFTR, фактора IX, липопротеинлипазы (LPL, предпочтительно, LPL S447X; см. WO 01/00220), аполипопротеина A1, уридиндифосфат-глюкуронозилтрансферазы (UGT), белка, взаимодействующего с регулятором ГТФазы при пигментном ретините (RP-GRIP), цитокинов или интерлейкинов, подобных, например, IL-10, дистрофина, PBGD, NaGLU, Treg167, Treg289, EPO, IGF, IFN, GDNF, FOXP3, фактора VIII, VEGF, AGXT и инсулина. Более предпочтительно, представляющий интерес продукт гена кодирует белок фактор IX или фактор VIII.

В другом аспекте изобретение, таким образом, относится к способу получения AAV в клетке насекомого. Предпочтительно, способ включает стадии: (a) культивирования клетки насекомого, как определено в настоящем описании выше, в таких условиях, чтобы происходила продукция AAV; и, необязательно, (b) выделения AAV. Условия выращивания для клеток насекомых в культуре, и получение гетерологичных продуктов в культуре клеток насекомых хорошо известны в данной области и описаны, например, в процитированных выше ссылках на молекулярное конструирование клеток насекомых.

Предпочтительно способ дополнительно включает стадию аффинной очистки AAV с использованием антитела против AAV, предпочтительно, иммобилизованного антитела. Антитело против AAV, предпочтительно, представляет собой моноклональное антитело.

Особенно подходящим антителом является одноцепочечное антитело верблюжьих или его фрагмент, например, как можно получать от верблюдов или лам (см., например, Muyldermans, 2001, *Biotechnol.* 74: 277-302). Антитело для аффинной очистки AAV, предпочтительно, представляет собой антитело, которое специфически связывается с эпитопом на капсидном белке AAV, где, предпочтительно, эпитоп представляет собой эпитоп, который присутствует на капсидном белке AAV более чем одного серотипа. Например, антитело может быть образовано или отобрано на основе специфического связывания с капсидом AAV2, но, в то же самое время, оно может также специфически связываться с капсидами AAV1, AAV3 и AAV5.

В другом аспекте, настоящее изобретение относится к способу получения конструкции нуклеиновой кислоты, кодирующей парвовирусный капсидный белок, где указанная конструкция нуклеиновой кислоты имеет одно или несколько улучшенных свойств, где способ включает:

а) получение множества конструкций нуклеиновой кислоты, где каждая конструкция содержит:

нуклеотидную последовательность, кодирующую парвовирусный капсидный белок, функционально связанную с последовательностью для контроля экспрессии и по меньшей мере одной последовательностью парвовирусного инвертированного концевой повтора (ITR), фланкирующей указанную нуклеотидную последовательность, кодирующую парвовирусный капсидный белок, функционально связанную с последовательностью для контроля экспрессии;

б) перенос множества конструкций нуклеиновой кислоты в клетки насекомых, способные экспрессировать парвовирусный белок Rep;

с) подвергание клеток насекомых воздействию условий, позволяющих экспрессию парвовирусного капсидного белка и парвовирусного белка гер, таким образом, что конструкции нуклеиновой кислоты можно упаковывать в парвовирусные капсиды для получения парвовирусных вирионов;

д) выделение парвовирусных вирионов из клеток насекомых и/или супернатанта клеток насекомых;

е) приведение указанных парвовирусных вирионов в контакт с клеткой-мишенью для обеспечения инфекции клетки-мишени;

ф) выделение или идентификацию конструкций нуклеиновой кислоты из клеток-мишеней.

Как показано в разделе примеры и как описано выше, этот способ является особенно полезным для отбора сначала всех конструкций нуклеиновой кислоты, которые являются высокофункциональными в клетках насекомых, в том смысле, что конструкции являются способными к продукции хороших количеств капсидов, содержащих геном вектора, но также являются способными к получению конструкций, содержащих капсиды, которые являются высокоэффективными для переноса, и последующей экспрессии, своей ДНК в клетке-мишени.

Понятно, что под множеством конструкций нуклеиновой кислоты, понимают конструкции, изменчивые в отношении последовательностей для контроля экспрессии и/или последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотную последовательность капсидного белка, и/или аминокислотной последовательности капсидного белка и/или последовательности(последовательностей) ИТР. Таким образом, любой их вариант может быть предусмотрен. Применительно к любому улучшению свойств, оно может присутствовать по сравнению с эталонной последовательностью, например, последовательностью дикого типа или конструкцией нуклеиновой кислоты предшествующего уровня техники для продукции капсида AAV в клетках насекомых. Может быть предусмотрено любое свойство, которое может нуждаться в улучшении, которое относится к последовательностям, которые могут меняться во множестве конструкций нуклеиновой кислоты. Такие свойства могут включать, но без ограничения, например, улучшенную активность, улучшенный выход, улучшенную избирательность для клетки-мишени.

Получение молекулярного разнообразия или мутагенез является первой стадией способа по изобретению. Посредством введения случайных точечных мутаций в эталонную последовательность, для которой запланировано улучшение, например, посредством ПЦР пониженной точности (EP), получают множество нуклеиновых кислот, кодирующих мутантные последовательности (т.е. библиотеку мутантных нуклеиновых кислот). Как указано, указанные случайные мутации могут содержаться в неcodирующих последовательностях и/или кодирующих последовательностях. Частоту мутаций, которые можно вводить, можно менять посредством изменения количества матрицы и циклов ПЦР, и используемых праймеров для мутагенеза. Понятно, что при ссылке на множество, оно включает 100 или более, предпочтительно, 1000 или более, 10000 или более, 100000 или более, или 10000000 или более различных последовательностей, в зависимости от изменчивости, которую необходимо внести в множество конструкций нуклеиновой кислоты. Понятно, что термины «библиотека» или «множество» могут иметь одинаковое значение в настоящем описании, в том смысле, что они относятся к большому количеству различных последовательностей, которые могут, например, являться родственными, т.е. иметь значительную идентичность последовательности. Каждый член библиотеки, т.е., каждая различная последовательность может быть представлена в библиотеке более 1 раза. Например, когда библиотека содержит 1000 уникальных последовательностей, библиотека может содержать суммарно 1000000 последовательностей. Это означает, что в среднем 1000 копий каждого члена библиотеки присутствует в библиотеке.

Мутагенез можно проводить любым способом, известным специалисту в данной области. Например, такой мутагенез может быть случайным, хотя такой мутагенез может быть направленным (т.е. например, для нацеливания на специфические последовательности/структуры в конструкции нуклеиновой кислоты). Случайный мутагенез можно проводить для достижения низких частот мутаций, например, для получения последовательностей, кодирующих белок Cap, имеющий одну, две, три,

четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять или более аминокислотных замен (по сравнению с исходной последовательностью, для которой проводили мутагенез).

Способы, которые можно использовать для проведения случайного мутагенеза, включают использование *E. coli* XL1red, облучение УФ, химические способы (например, дезаминирование, алкилирование или использование мутагенов - аналогов оснований) или способы на основе ПЦР (например, перетасовку ДНК, сайт-направленный случайный мутагенез или ПЦР пониженной точности).

ПЦР пониженной точности представляет собой модификацию стандартных способов ПЦР, разработанную для изменения и увеличения естественной частоты ошибок полимеразы. Можно использовать Taq-полимеразу из-за ее естественно высокой частоты ошибок, со сдвигом ошибок в сторону замен АТ на GC. Однако можно также использовать альтернативные формы полимераз, сдвиги которых позволяют увеличенную изменчивость типа мутаций (т.е., больше замен GC на АТ).

Реакционные смеси для ПЦР с пониженной точностью, как правило, содержат более высокие концентрации $MgCl_2$, по сравнению с основными реакционными смесями для ПЦР, для стабилизации некомплементарных пар. $MgCl_2$ можно также добавлять для увеличения частоты ошибок. Другие способы модификации частоты мутаций включают изменение соотношений нуклеотидов в реакционной смеси, или включение аналога нуклеотида, такого как 8-оксо-ГТФ или дИТФ. Частоту мутаций можно также модифицировать посредством изменения количества эффективных удвоений посредством увеличения/уменьшения количества циклов или посредством изменения исходной концентрации матрицы.

В любом случае, каким бы способом не вводили мутации, полученное множество последовательностей затем клонируют в конструкцию нуклеиновой кислоты для получения множества конструкций нуклеиновой кислоты. Указанная конструкция нуклеиновой кислоты содержит один или несколько парвовирусных ITR или ITR AAV, фланкирующих нуклеотидную последовательность, кодирующую парвовирусный капсидный белок, функционально связанную с последовательностью для контроля экспрессии (как правило, фланкированную двумя ITR AAV). Указанная конструкция нуклеиновой кислоты может также содержать, например, между ITR, необязательно, экспрессирующую репортерный ген кассету, например, экспрессирующую зеленый флуоресцентный белок (GFP) кассету, под контролем промотора, такого как промотор CMV и промотор p10 бакуловируса. Множество конструкций можно затем вводить в намеченный вектор, например, в бакуловирусный вектор, для получения библиотеки бакуловирусов. Это можно легко осуществлять с использованием общепринятых биомолекулярных способов, таких как гомологичная рекомбинация, а также с использованием коммерчески доступных систем, подобных Vas-to-Vas. Каждый бакуловирус в библиотеке содержит одиночную конструкцию нуклеиновой кислоты, где одиночные конструкции нуклеиновой кислоты имеют намеченную изменчивость последовательности. Сложность библиотеки, предпочтительно, поддерживают, когда

получают библиотеку бакуловирусов (т.е. количество уникальных последовательностей в библиотеке бакуловирусов остается приблизительно одинаковым, при сравнении с библиотекой нуклеиновых кислот). Таким образом, предпочтительно, конструкции нуклеиновой кислоты, как определено на стадии а) способа выше, содержатся в бакуловирусных векторах.

Затем, множество конструкций переносят в клетки насекомых. Предпочтительно, используют множество бакуловирусов. Это происходит потому, что для бакуловирусов множественность инфекции можно хорошо контролировать. Таким образом, при использовании библиотеки бакуловирусов, множественность инфекции предпочтительно, поддерживают ниже 1, предпочтительно, ниже 0,5, более предпочтительно, ниже 0,1. Например, при moi 0,5, большая часть клеток насекомых будут иметь один бакуловирус на клетку, однако, значительная часть этих клеток будет иметь два бакуловируса из библиотеки на клетку, и большинство клеток не будет инфицировано. Количество бакуловирусов на клетку подчиняется распределению Пуассона. Снижение moi уменьшает количество клеток, имеющих более 1 бакуловируса, даже дополнительно. Однако по изобретению может не являться необходимым знать множественность инфекции. Например, как показано в разделе примеры, можно использовать также серийные разведения множества бакуловирусов, и можно выбирать разведение, обеспечивающее оптимальную продукцию библиотеки векторов AAV (например, самый высокий титр и/или самую меньшую перекрестную упаковку).

Указанные клетки насекомых, для которых предоставлено множество конструкций, также являются способными экспрессировать парвовирусный белок Rep. Например, дополнительный бакуловирус, содержащий экспрессирующую Rep конструкцию, можно использовать для переноса экспрессирующей Rep конструкции в клетки. Предпочтительно, используют относительно высокую множественность инфекции, так чтобы Rep не являлся ограничивающим фактором, т.е. когда получена клетка с одной из множества конструкций, был велик шанс, что клетка имеет также экспрессирующую Rep конструкцию. Альтернативно, можно также использовать стабильную линию клеток, содержащую экспрессирующую Rep конструкцию, которая может конститутивно экспрессировать белок Rep, или которая может индуцируемым образом экспрессировать Rep, когда одна из множества конструкций перенесена в клетки. В любом случае, указанные клетки насекомых, которые способны экспрессировать парвовирусный белок Rep, и которые получены с одной (или более) из множества конструкций по изобретению, затем подвергают воздействию условий, позволяющих экспрессию парвовирусного капсидного белка и парвовирусного белка гер, таким образом, что конструкции нуклеиновой кислоты могут быть упакованы в парвовирусные капсиды для получения парвовирусных вирионов. По большей части это включает культивирование клеток в течение некоторого времени, например, когда используют бакуловирусную систему. Предпочтительно, когда используют бакуловирусную векторную систему, выбирают условия, которые не позволяют распространение бакуловирусов до такой степени, что

многие, если не все клетки будут содержать несколько членов библиотеки конструкций. Условия предпочтительно выбирают таким образом, чтобы большинство клеток, содержащих конструкцию из библиотеки, содержали одну конструкцию и продуцировали только парвовирусный капсид, кодированный указанной конструкцией, который также содержит указанную одну конструкцию. Когда выбирают условия, при которых более одной конструкции может содержаться в клетке насекомого, где одна из конструкций продуцирует инфекционный или активный AAV, конструкции, которые являются намного менее активными или не инфекционными, могут подвергаться перекрестной упаковке, что затрудняет определение того, какая конструкция из всех упакованных конструкций, является способной продуцировать активный AAV. Иными словами, присутствие низкой перекрестной упаковки позволяет более строгий и более эффективный отбор.

Затем, парвовирусные вирионы выделяют из клеток насекомых и/или супернатанта клеток насекомых. Множество способов выделения парвовирусных вирионов являются доступными и включают такой способ, как описано в разделе примеры. Также, можно использовать общепринятые способы, такие как центрифугирование в (ступенчатом) градиенте плотности (йодиксанола, CsCl) и/или проточная фильтрация вдоль потока. Такие общепринятые способы могут являться полезными, когда, например, в капсидные последовательности вводят изменения, которые могут оказывать эффект на аффинную хроматографию. Тем не менее, можно также предусматривать включение стадии специфической аффинной хроматографии, в качестве одного из признаков, на основании которых можно отбирать конструкции. Таким образом, признаки улучшенной специфической аффинной хроматографии могут представлять собой одни из признаков, которые также можно рассматривать для улучшения. Тем не менее, эффективная продукция в клетках насекомых и инфекционность или активность остаются признаками, которые необходимо сохранить и/или которые можно улучшить.

В другом варианте осуществления, настоящее изобретение относится к библиотеке парвовирусных вирионов, полученной способами, как описано выше. В следующем варианте осуществления, настоящее изобретение относится к библиотеке парвовирусов, содержащей множество парвовирусных векторов, где указанная библиотека парвовирусных векторов содержит капсиды парвовирусных векторов, где каждый парвовирусный капсид содержит геном парвовирусного вектора, содержащий экспрессирующие кассеты для экспрессии парвовирусных капсидных белков. Предпочтительно, указанная библиотека парвовирусных векторов, содержащая множество парвовирусных векторов, содержит капсиды парвовирусных векторов, где каждый парвовирусный капсид содержит геном парвовирусного вектора, содержащий экспрессирующие кассеты для экспрессии парвовирусных капсидных белков в клетках насекомых. Более предпочтительно, указанная библиотека парвовирусных векторов, содержащая множество парвовирусных векторов, содержит капсиды парвовирусных векторов, где по существу для каждого парвовирусного капсида, содержащегося в библиотеке, парвовирусный капсид содержит геном парвовирусного вектора, содержащий

экспрессирующие кассеты для экспрессии в клетках насекомых белков парвовирусного капсида, в который он инкапсидирован. Альтернативно, как указано, геном вектора может, необязательно, содержать экспрессирующую кассету, но может также содержать идентификатор последовательности, посредством которого аминокислотную последовательность парвовируса (и/или кодирующую ее экспрессирующую кассету), в который инкапсидирован геном вектора, можно идентифицировать (см. фигуру 6). Иными словами, библиотека содержит в основном парвовирусные капсиды, которые могут содержать любую последовательность внутри инкапсидированного генома вектора, при условии, что по последовательности, содержащейся внутри генома вектора, соответствующий парвовирусный капсид (т.е., его аминокислотную последовательность), в котором она содержится, можно идентифицировать.

Специфические идентификаторы последовательностей (см. фигуру 6B), которые можно предусматривать, предпочтительно, имеют длину по меньшей мере 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 нуклеотидов. Специфические идентификаторы последовательностей, которые можно предусматривать, могут иметь длину самое большее 50, 60, 70, 80 или 90 нуклеотидов. С идентификатором последовательности по меньшей мере из 15 нуклеотидов, являются возможными приблизительно 10^9 возможных уникальных комбинаций. Наличие более длинных идентификаторов последовательностей может обеспечивать большую избыточность и более надежную идентификацию. Понятно, что идентификатор последовательности может быть заведомо связан со специфической последовательностью капсида. Таким образом, когда при такой схеме идентификатор последовательности секвенируют или детектируют, можно со ссылкой на таблицу идентифицировать соответствующую экспрессирующую кассету капсида. Альтернативно, можно использовать идентификатор последовательности посредством связывания и/или секвенирования генома вектора-носителя, такого как геном бакуловируса, таким образом, что можно определять последовательность экспрессирующей кассеты капсида или ее части, которая ассоциирована с идентификатором последовательности. Такой анализ и/или определение последовательности можно выполнять впоследствии. Такие средства и способы для определения последовательности с использованием высокопроизводительных технологий для идентификации последовательностей из сложных библиотек хорошо известны в данной области.

Библиотеки по изобретению, как описано выше, или полученные, как описано выше, могут быть предоставлены в форме грубого лизата или очищенного продукта. В частности, такие библиотеки можно, предпочтительно, получать из вирусного вектора, который содержит геном вектора и кодирует парвовирусный капсидный белок. Предпочтительный вектор, используемый для получения библиотеки, может представлять собой бакуловирусный вектор, содержащий экспрессирующие кассеты для указанного парвовирусного капсидного белка, которые являются активными в клетках насекомых. Альтернативно, вполне можно предполагать, что можно предусматривать любую альтернативную подходящую библиотеку вирусных векторов и линию клеток, например,

такие как система на основе аденовирусного вектора, HSV, лентивирусного вектора, которые можно использовать вместо бакуловируса, где экспрессирующая кассета для капсидного белка является подходящей для (или предназначенной для отбора по) экспрессии в клетках млекопитающих, например, таких как клетки HeLa, клетки 293, клетки CHO, A549, 293T, COS. Такие альтернативные векторы-носители и подходящие линии клеток, которые можно предусматривать, хорошо известны в данной области например, как описано в 4th edition of *Gene and Cell Therapy - Therapeutic Mechanisms and strategies*, edited by Nancy Smith Templeton, 2015, CRC Press. Таким образом, в альтернативном варианте осуществления, вместо использования бакуловирусных векторов и клеток насекомых, можно легко использовать средства и способы, как описано в настоящем описании, для клеток млекопитающих, в комбинации с подходящими вирусами-носителями для млекопитающих. В любом случае, поскольку библиотеки парвовирусных векторов, полученные в соответствии с изобретением, такие как библиотеки векторов AAV, получают с использованием вектора-носителя, позволяющего контроль количества копий на клетку-продуцента, качество библиотек вектора значительно улучшено, по сравнению с полученными в плазмидах библиотеками, которые не позволяют такого контроля.

Затем, парвовирусные вирионы выделяют, или если перефразировать, получают библиотеку парвовирусных векторов, которая может представлять собой грубый лизат или очищенный продукт, парвовирусные вирионы из нее затем приводят в контакт с выбранной клеткой-мишенью, чтобы позволить парвовирусам инфицировать клетки-мишени. Можно выбирать подходящие клетки-мишени, которые могут представлять собой подходящие клетки-мишени, такие как клетки печени, клетки почки, нейроны, для которых разрабатывают генотерапию. Подходящие клетки-мишени могут представлять собой любые линии клеток, например, такие как клетки HeLa, клетки HEK293 или клетки NuH, или могут представлять собой первичные клетки. Можно даже предусматривать, что это включает доставку в подходящую модель на животном, например, крысе, мыши, обезьяне, а также может включать различные способы доставки, например, внутривенные или внутримышечные инъекции, и что последующие клетки-мишени представляют собой выбранный орган-кандидат в такой модели на животном. В любом случае, можно выбирать любой тип клеток, и парвовирусные вирионы можно приводить в контакт с ними любым способом, т.е., *in vivo* или *in vitro*, чтобы обеспечивать инфекцию, т.е., перенос конструкции нуклеиновой кислоты, содержащейся внутри капсидов вирионов, в клетки. Понятно, что клетки можно также, например, совместно инфицировать аденовирусом, чтобы способствовать процессу трансдукции, например, для индукции трансдукции. Это может быть полезным, например, когда конструкция репортерного гена содержится внутри конструкции нуклеиновой кислоты, и желательно выбрать клетки, которые не только позволяют эффективный перенос ДНК, но также позволяют эффективную миграцию внутри клетки для доставки конструкции нуклеиновой кислоты в ядро (см. фигуру 6). Без связи с теорией, когда капсидные последовательности подвергают

мутагенезу, и/или стехиометрическое соотношение VP1, VP2 и VP3 изменяют, это может приводить к препятствованию внутренней миграции. Например, капсиды, лишенные VP1, могут инфицировать клетки, но не входят в ядро. Капсиды, содержащие конструкции нуклеиновой кислоты, тогда остаются в эндосоме и являются мишенями для протеолиза протеасомой. Таким образом, может представлять интерес включение стадии отбора на основании цели способа отбора, т.е. для достижения эффективной доставки конструкции нуклеиновой кислоты в ядро, чтобы обеспечивать экспрессию с конструкции нуклеиновой кислоты. Это можно осуществлять, например, посредством репортерного гена или любого другого представляющего интерес гена. Это могут быть также клетки HeLa RC32, или т.п., где вирионы, достигающие эффективной доставки генома вектора, амплифицируются.

Наконец, когда клеткам позволяют инфицировать клетки-мишени, предпочтительно, чтобы обеспечивать эффективную трансдукцию, конструкции нуклеиновой кислоты выделяют из клеток-мишеней. Можно выделять конструкции нуклеиновой кислоты из полной популяции клеток. Можно выделять также конструкции нуклеиновой кислоты из подгруппы популяции клеток, например, из подгруппы, для которой показана экспрессия репортерного трансгена и которая являлась, таким образом, эффективной для трансдукции клетки-мишени. Можно выделять также конструкции нуклеиновой кислоты из популяции цельных клеток, но, в частности, из ядер из цельных клеток. Этим способом можно отбирать конструкции нуклеиновой кислоты (и одновременно также кодируемые ими капсиды), как ожидают, хорошие для трансдукции клеток-мишеней. Затем выделенные конструкции нуклеиновой кислоты можно подвергать секвенированию для идентификации конструкций нуклеиновой кислоты. Как указано, конструкции нуклеиновой кислоты могут содержать идентификатор последовательности для идентификации конструкций. Понятно также, что когда, например, бакуловирусную векторную систему и клетки насекомых используют для получения библиотек парвовирусных векторов, и геном парвовирусного вектора содержит экспрессирующую кассету для парвовирусного капсида, в котором он содержится, указанную экспрессирующую кассету, или ее часть, можно рассматривать как идентификатор последовательности. Указанная экспрессирующая кассета при введении в клетки млекопитающих может не продуцировать капсид AAV, когда она имеет промотор из клетки насекомого, а не промотор, активный в клетках млекопитающих. В частности, часть конструкции нуклеиновой кислоты, в которую вводили изменение (или соответствующий идентификатор последовательности) можно подвергать секвенированию, например, после реакции ПЦР, где участок этой части быстро амплифицируют. Можно также секвенировать полную конструкцию нуклеиновой кислоты или полную кодирующую капсид последовательность. Понятно, что секвенирование включает высокопроизводительное секвенирование или любой другой пригодный способ секвенирования, известный в данной области.

Особенный интерес может представлять идентификация улучшенных

последовательностей. Когда условия выбирают таким образом, что они являются строго ограничивающими, все выделенные конструкции нуклеиновой кислоты и их последовательности представляют собой улучшенные конструкции нуклеиновой кислоты. Таким образом, выделение конструкций нуклеиновой кислоты включает отбор улучшенных конструкций нуклеиновой кислоты. Тем не менее, можно подтверждать или идентифицировать улучшенные последовательности, происходящие из выделенных конструкций нуклеиновой кислоты, посредством сравнения выделенной популяции последовательностей, например, с популяцией последовательностей, содержащейся в библиотеке, сконструированной первоначально. Выделенные последовательности, сильно доминирующие в выделенной популяции, по сравнению с исходной популяцией, имеют показатели того, что являются желательными улучшенными конструкциями нуклеиновой кислоты. Таким образом, в дополнение к выделению конструкций нуклеиновой кислоты, дополнительная стадия может включать идентификацию конструкций нуклеиновой кислоты из библиотеки, которые соответствуют улучшенным конструкциям нуклеиновой кислоты. Такая идентификация может включать сравнение с популяцией последовательностей из одной или нескольких, например, из исходной библиотеки, библиотек бакуловирусов, содержащих конструкции нуклеиновой кислоты, популяции конструкций нуклеиновой кислоты, содержащихся в парвовирусных капсидах.

После получения или идентификации конструкции нуклеиновой кислоты, имеющей улучшенные свойства, по которым она отобрана, следующей стадией является стадия g), получения конструкции нуклеиновой кислоты для получения генотерапевтического вектора, содержащего нуклеотидную последовательность, кодирующую парвовирусный капсидный белок, функционально связанную с последовательностью для контроля экспрессии, как выделено на стадии f). Конструкция нуклеиновой кислоты для получения генотерапевтического вектора не имеет экспрессирующей конструкции для парвовирусного капсидного белка, фланкированной парвовирусными последовательностями ITR. Таким образом, конструкция нуклеиновой кислоты для получения генотерапевтического вектора, предпочтительно, содержит экспрессирующую конструкцию для парвовирусного капсидного белка, и может, необязательно, содержать дополнительные парвовирусные составляющие, например, такие как генотерапевтическая конструкция, т.е., терапевтический ген, фланкированный парвовирусными ITR, и/или экспрессирующие Rep конструкции, где все конструкции сконструированы для совместимости с продукцией в клетках насекомых. Таким образом, предпочтительно, указанная полученная конструкция нуклеиновой кислоты содержится в бакуловирусном векторе или в клетке насекомого. Поскольку вирусные векторы AAV являются хорошими кандидатами для генотерапии, в частности, указанный парвовирусный капсидный белок, парвовирусный белок Rep и/или нуклеотидные последовательности ITR, предпочтительно, происходят из аденоассоциированного вируса. Понятно, что выделенная конструкция нуклеиновой кислоты, которую используют для получения конструкции нуклеиновой кислоты для получения генотерапевтического

вектора, может фактически представлять собой физическую нуклеиновую кислоту, например, как получено посредством вырезания из выделенной конструкции нуклеиновой кислоты представляющей интерес последовательности. Альтернативно, представляющую интерес последовательность, например, экспрессирующую парвовирусный капсид кассету или ее часть, можно амплифицировать посредством реакции ПЦР и впоследствии использовать. Также, можно определять последовательность, и представляющую интерес последовательность можно получать *de novo*, например, посредством синтезатора ДНК.

Поскольку весь процесс отбора предназначен для идентификации улучшенных конструкций для основанного на клетках насекомых получения генотерапевтических векторов для использования в медицинском лечении, в следующем варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу получения парвовирусного вектора, содержащему стадии а) - g), как описано выше, где получают клетку насекомого

с

- указанной полученной конструкцией нуклеиновой кислоты для продукции генотерапевтического вектора

- конструкцией нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность инвертированного концевой повтора (ITR); и

- конструкцией нуклеиновой кислоты, кодирующей парвовирусный белок Rep, способной экспрессировать парвовирусный белок Rep в клетке насекомого;

где клетку насекомого культивируют в таких условиях, что происходит продукция парвовирусного вектора; и необязательно, (b) выделение продуцированного парвовирусного вектора. Предпочтительно, указанный парвовирусный вектор представляет собой вектор AAV. Таким образом, любой из способов, как описано выше, для продукции вектора AAV с экспрессирующей VP1, VP2 и VP3 конструкцией, имеющей находящийся вне рамки иницирующий кодон перед кодоном ATG VP1, применим для любой идентифицированной улучшенной конструкции, а также для полученной конструкции нуклеиновой кислоты для получения генотерапевтического вектора.

В этом описании и в формуле изобретения, слово «содержать» и его спряжения используют в их неограничивающем смысле для обозначения того, что пункты, следующие за словом, включены, но пункты, не упомянутые конкретно, не исключены. Кроме того, ссылка на неконкретизированный элемент единственного числа не исключает возможности того, что присутствует более одного из элементов, если контекст явно не требует того, чтобы присутствовал один и только один из элементов. Неконкретизированный элемент единственного числа, таким образом, обычно означает «по меньшей мере один».

Полное содержание всех патентов и литературных источников, процитированных в настоящем описании, таким образом, приведено в качестве ссылки.

Следующие примеры предложены только с целью иллюстрации и не предназначены для ограничения объема настоящего изобретения никаким образом.

Примеры

1. Введение

Экспрессия капсида AAV в бакуловирусной системе экспрессии (BEVS) требует модификации экспрессирующей кассеты, чтобы способствовать образованию одиночного транскрипта мРНК с получением в результате продукции трех вирусных капсидных белков в правильном соотношении. Работа, выполненная Urabe et al (2002; выше), показала, что адаптация иницирующего кодона в сочетании с удалением участка сплайсинга интрона приводила к экспрессии всех трех белков VP в клетках насекомых. Дальнейшая работа показала, что CTG и GTG можно использовать в качестве эффективных иницирующих кодонов для продукции AAV в системе BEVS.

Одновременно, аланин во втором положении, например, при его введении в последовательность капсида AAV5, приводил к образованию капсида AAV5 с природным соотношением капсидных белков VP1-VP3.

Однако, в способе рационального дизайна ограниченная подгруппа конструкций и комбинаций являются возможными из-за трудоемкой работы для получения рекомбинантных бакуловирусов. Таким образом, использовали способ библиотеки, разработанной для дизайна серий альтернативных иницирующих кодонов (всего 17) в комбинации с рандомизированным контекстом последовательности внутри капсида AAV5, чтобы определить, существует ли еще возможность для выбора улучшений качества и выхода капсида AAV из системы BEVS (см. на фигуре 1 описание способа). Результаты и способ, описанные ниже, не являются ограниченными AAV5, но могут являться применимыми также к другим серотипам и другим парвовирусам, и могут быть также использованы для выбора улучшений других признаков парвовирусных генотерапевтических векторов.

Материалы и методы

Дизайн конструкции и плазмидная библиотека

Следующие альтернативные предположительные иницирующие кодоны среди различных эукариот и прокариот обнаружены в литературе и использованы в качестве возможных иницирующих кодонов для продукции VP1 AAV5: ATT, ATG, ATA, AGA, AGG, AAA, CTG, CTT, CTC, CTA, CGA, CGC, TTG, TGA, TAA, TAG и GTG. Конструкция имела следующий контекстный дизайн: NNN NNN NNN GNN NNN (SEQ ID NO:71). При этом NNN показывает вставку любого из вышеуказанных иницирующих кодонов для VP1, в то время как N представляет собой A, T, C или G, случайно, с равным распределением. «G» в первом тримере после иницирующего кодона является фиксированным. Теоретическую сложность этой библиотеки рассчитывают как $7,1 \times 10^7$ ($4^{11 \times 17}$), т.е., максимальное количество уникальных последовательностей, которое можно получить. Библиотека иницирующих кодонов синтезирована в GeneArt (ThermoFisher), и полные последовательности с кодирующими капсид AAV5 последовательностями и последовательностями для экспрессии гена клонировали в содержащую ITR плазмиду таким образом, чтобы полученный капсид AAV имел кодирующий капсид ген,

инкапсулированный внутри в качестве трансгена. Плазмидную библиотеку получали в GeneArt, где 100 отдельных колоний из библиотеки подвергали секвенированию по Сэнгеру для подтверждения сложности и разнообразия внутри библиотеки.

Библиотека бакуловировусов

Чтобы использовать мощность системы BEVS и таким образом, провести скрининг новых видов дизайна по их совместимости с системой BEVS, авторы настоящего изобретения получили библиотеку рекомбинантных бакуловировусов из вышеуказанной поставленной плазмидной библиотеки. Теоретическое разнообразие библиотеки составляет $7,1 \times 10^7$. В стандартном способе рекомбинации, авторы настоящего изобретения использовали 1 мкг донорной плазмиды ($8,12 \times 10^{10}$ молекул плазмиды) с 1 мкг расщепленного Bsu36I бакуловировусного остова BacAMT5 ($7,34 \times 10^9$ молекул). Ограничивающим фактором являлся бакуловировусный остов, представляющий теоретическую сложность библиотеки в 10^3 выше в случае 100% эффективности рекомбинации. Пулированную библиотеку P0 амплифицировали в клетках SF9, где ожидали амплификацию бакуловировусов приблизительно в 1000 раз, с получением в результате библиотеки P1, представляющей полную сложную библиотеку.

Получение библиотеки AAV

Для получения библиотеки AAV, клетки SF9 инокулировали при 1 миллионе клеток на мл. MOI (множественность инфекции) рассчитывали следующим образом: $MOI = 0,7 \times \text{объем вируса} \times \text{титр/плотность клеток} \times \text{объем клеток}$. Авторы настоящего изобретения определили, что при пассаже P1 библиотека бакуловировусов имела титр приблизительно 2×10^{11} гк/мл. В среднем, значения TCID₅₀ для бакуловировусов оценивали как составляющие значения, приблизительно на 2 log ниже титра геномных копий. В результате получили оцененное значение TCID₅₀ 2×10^9 /мл. Первую библиотеку AAV (MOI 0,5) получали с использованием рассчитанного инфекционного титра 2×10^9 для библиотеки бакуловировусов P1. Посредством инокуляции 3 л клеток насекомых при 1 миллионе клеток на мл, авторы настоящего изобретения получили MOI 0,5 для капсида/трансгена. Иными словами, менее одной инфекционной частицы на клетку. Поскольку капсид также является трансгеном, (и таким образом капсид) кассету можно амплифицировать посредством репликазы приблизительно в 1000 раз на клетку. Эта двойная инфекция также является статистически более эффективной, применительно к распределению Пуассона, по сравнению с тройной инфекцией. Три дополнительных библиотеки AAV получали с использованием оцененных MOI 5, 25 и 50. Обнаружено, что полученная библиотека AAV с MOI 0,5 имела наилучшую активность в способе отбора.

Очистка и количественная оценка AAV

Материал библиотеки AAV очищали из 3 л CLB на 5 мл колонке с сефарозой AVB (аффинная хроматография) на устройстве Akta Explorer. ДНК выделяли, и qПЦР проводили для каждой фракции с использованием праймеров, амплифицирующих последовательность генома вектора AAV. Из этого, авторы настоящего изобретения пулировали фракции для модифицированного анализа TCID₅₀ на клетках HeLa RC32,

чтобы оказывать селективное давление на новые мутанты в библиотеке. См. ниже. Три других продукта AAV (MOI 5, 25 и 50, соответственно) выделяли сходным способом. Из всех выделенных библиотек AAV выделяли ДНК для секвенирования нового поколения (NGS).

Селективное давление на библиотеку AAV

Модифицированный анализ TCID₅₀ на клетках HeLa RC32 (Tessier J, et al. J. Virol. 75(1):375-383, 2001) использовали для отбора вариантов AAV, имеющих наивысшую активность. Клетки HeLa RC32 содержат гены репликазы и капсида AAV2, встроенные в геном. После трансдукции с использованием AAV, трансген амплифицируется посредством репликазы и упаковывается в капсид AAV, который также образуется внутри клеток HeLa. Преимуществом этой линии клеток в принципе является то, что репликаза действует в качестве амплификатора любой ДНК AAV, которая входит в ядро. Посредством получения серий лимитирующих разведений AAV и инфекции клеток HeLa, авторы настоящего изобретения могли успешно амплифицировать только те AAV, которым удалось успешно достигнуть ядра. Иными словами, отбирать капсиды AAV и конструкции, которые содержат/кодируют VP1:VP2:VP3 в хорошем соотношении. Серии разведений, использованные для трансдукции клеток HeLa, представляли собой: 6400 гк/клетку, 3200 гк/клетку, 1600 гк/клетку, 800 гк/клетку, 400 гк/клетку и 200 гк/клетку.

Выделение ДНК AAV

Через двое суток после трансдукции, клетки HeLa лизировали и подвергали выделению ДНК для выделения геномов вектора AAV, из которых геномы вектора, достигшие ядра, амплифицируются в клетках HeLa. ПЦР с анализом результатов по конечной точке с использованием универсального набора праймеров для библиотеки капсидов проводили для выделенной ДНК до отправки на секвенирование нового поколения (NGS).

Секвенирование NGS различных библиотек

Секвенирование NGS проводили для выделенной ДНК из плазмидной библиотеки, пассажа P1 библиотеки бакуловирусов, продуктов библиотеки AAV, так же как ДНК, выделенной из пулированных разведений для трансдукции библиотеки AAV. Подготовленную ДНК для каждой реакции секвенирования посылали в BaseClear для амплификации и добавления штрих-кодов.

Результаты

Библиотеку AAV получали после инфекции с MOI 0,5. После продукции библиотеки AAV, библиотеку использовали для инфекции клеток HeLaRC32. Плазмидную библиотеку, библиотеку бакуловирусов, библиотеку AAV и инфицированные HeLaRC32 перерабатывали и анализировали посредством секвенирования генов нового поколения для определения их сложности. Уникальные последовательности идентифицировали на каждой стадии, и определяли также количество копий каждой уникальной последовательности, определяли общее количество последовательностей, и относительные проценты для каждого иницирующего кодона

определяли и наносили на график (см. фигуры 2А-Е). Полученная библиотека бакуловирусов представляла по оценке 74% от сложности плазмидной библиотеки. Среди плазмидной библиотеки и библиотеки бакуловирусов не присутствовало поразительных наблюдений применительно к распространенности иницирующих кодонов (см. фигуры 2А и 2В), что было ожидаемым, поскольку не присутствовало приложенного к ним селективного давления. Однако, когда АТГ использовали в качестве иницирующего кодона, эту последовательность обнаружили в наименьшем количестве в капсидах ААV (см., например, фигуру 2С). В этом случае, АТГ представляет менее чем 0,5% из суммарной библиотеки. Этот низкий процент был ожидаемым, поскольку сильный иницирующий кодон для VP1 образует по большей части белки VP1 с очень малой продукцией или с отсутствием продукции белков VP2 и VP3, из которых VP3, как правило, является необходимым для получения капсидов. Для остальных, среди плазмидной библиотеки, библиотеки бакуловирусов и библиотеки капсидов ААV, не сделано поразительных наблюдений применительно к процентам, применительно к использованию кодонов, поскольку они все находились в пределах нормального диапазона изменчивости (в диапазоне от приблизительно 4-5% до приблизительно 8-9%). Наконец, библиотека ААV, как правило представляет приблизительно 96% от сложности библиотеки бакуловирусов, что позволяет предполагать всеобъемлющий перенос сложности при получении ААV из библиотеки бакуловирусов. Наконец, когда клетки HeLa RC32 инфицировали с использованием библиотеки ААV в сериях лимитирующих разведений, авторы настоящего изобретения обнаружили, что СТГ и GTG являлись двумя наиболее распространенными иницирующими кодонами для продукции активных частиц вирусного капсида ААV в бакуловирусной системе экспрессии. СТГ и GTG вместе составляют почти 50% из всех последовательностей, которые успешно трансдуцировали и инфицировали клетки (т.е. переносили ДНК генома вектора в ядро, чтобы позволять амплификацию посредством клеток HeLaRC32). Поразительно, хотя только кодон, непосредственно следующий за иницирующим кодоном, был ограничен G, обнаружено, что кодон после иницирующего кодона преимущественно кодирует аланин (не показано), подтверждая, что тример, кодирующий Ala, может иметь предпочтительность в качестве второго кодона для экспрессии VP1 в клетках насекомых, из-за аминокислотной последовательности и/или из-за последовательности ДНК/РНК. Поразительно, что последовательности, выделенные из клеток, позволяют предполагать только 5% сохранение сложности библиотеки ААV. Это показывает, что селективное давление являлось значительным.

Интересно, что АТГ в качестве иницирующего кодона является третьим из наиболее распространенных иницирующих кодонов в выделенной ДНК из клеток HeLa RC32, при приблизительно 8% в полной библиотеке. Это отличается от представленности в библиотеке ААV только при 0,5%. Верхние тридцать последовательностей, имеющих иницирующий кодон VP1, перечислены ниже в таблице 1, с наиболее преобладающим, перечисленным сверху (SEQ ID NO.1), составляющим большинство популяции. Каждая

последовательность сама по себе позволяет эффективную продукцию капсидов AAV, при использовании в качестве последовательностей для замены контекста последовательности иницирующего кодона VP1. Хотя каждая последовательность сама по себе может иметь некоторые присущие ей свойства, позволяющие эффективную продукцию капсидов AAV, дополнительно из последовательностей, перечисленных ниже, можно идентифицировать основные признаки, которые могут описывать некоторые общие правила, управляющие эффективной продукцией активного AAV с иницирующего кодона ATG (см., среди прочего, фигуру 5). Они могут включать, но могут необязательно являться ограниченными этим, (находящийся вне рамки) иницирующий кодон перед иницирующим кодоном VP1, и/или последовательность GT непосредственно после кодона ATG, что предпочтительно приводит к валину в положении 2 капсида VP1. Для подавляющего большинства из 30 клонов наблюдали вышележащий находящийся вне рамки иницирующий кодон, который может действовать в качестве участка инициации трансляции (ATG, CTG, ACG, TTG и GTG). Ожидают, что такие иницирующие кодоны вне рамки приводят к коротким пептидам, имеющим стоп-кодон после иницирующего кодона VP1. Также, можно было идентифицировать неканонические находящиеся вне рамки иницирующие кодоны CTT или CTC. В то время как CTT и CTC не рассматривают в качестве сильных неканонических иницирующих кодонов, авторы настоящего изобретения наблюдали, что из клеток HeLa выделены различные капсиды, содержащие конкретно эти два иницирующих кодона. Без связи с теорией, это позволяет предполагать, что иницирующий кодон вне рамки, предшествующий ATG VP1, может действовать в качестве контекста инициации трансляции - ловушки для рибосомы, таким образом, создавая помехи для трансляции VP1 и позволяя рибосомное сканирование с псевдоподтеканием, как можно наблюдать для AAV дикого типа. Более конкретно, синтез (коротких) пептидов с этих альтернативных иницирующих кодонов может позволять рибосоме либо продолжать сканирование транскрипта мРНК, либо вызывать его повторную инициацию. Эта инициация с задержкой и подтеканием может позволять трансляцию VP2 и VP3 с одного полицистронного транскрипта мРНК. Кроме того, может быть доказано, что это напоминает то, что происходит, когда CTG, GTG, TTG и ACG вводят в качестве неканонических иницирующих кодонов (выданный Европейский патент No. 1945779 B1; выданный Патент США No. 8163543; Urabe et al 2002; выше), таким образом, позволяя рибосомам периодически не иницировать трансляцию на неканоническом иницирующем кодоне VP1, позволяя достаточную инициацию трансляции VP2 и VP3 с соответствующих им иницирующих кодонов в одном транскрипте мРНК.

SEQ ID NO.	Последовательность ДНК
69	CTNNNNNNATGGNNNNNTTT
1	CTCGATGCATGGTAAGCTTT
2	CTGAATACATGGTCACCTTT

3	CTAACTTAATGGTAGCATTT
4	CTCAATGGATGGTTAGTTTT
5	CTCGACGTATGGTCACATTT
6	CTCCCTGAATGGCATTGTTT
7	CTAGCACGATGGCGTCATTT
8	CTGACCGCATGGCGACGTTT
9	CTGGAGATATGGTGAGTTTT
10	CTTGTTTTATGGTAAGTTTT
11	CTCAGTTGATGGTCAGCTTT
12	CTACTTGTATGGTAGCTTTT
13	CTCGATGCATGGCAAGCTTT
14	CTGTTAGAATGGCGACGTTT
15	CTCGACCAATGGGAACGTTT
16	CTGGCGTCATGGGGTCGTTT
17	CTCGATGCATGGTAAGCTCT
18	CTCGATGCATGGTGAGCTTT
19	CTCGATGCATGGTAAGCCTT
20	CTCCTCGGATGGCGTCATTT
21	CTTGGGCGATGGTTTCATTT
22	CTAATTGAATGGCGGAGTTT
23	CTCGATGCATGGTAGGCTTT
24	CTCGATGCATGGTAAGCTTC
25	CTTTGCTTATGGTAAATTTT
26	CTCGACGCATGGTAAGCTTT
27	CTCACTTGATGGCTTAATTT
28	CTCAGGGAATGGGATTCTTT
29	CTTATTCTATGGTAAGTTTT
30	CTCGGTGCATGGTAAGCTTT

Таблица 1. Верхние 30 последовательностей из содержащих ATG клонов, выделенных из клеток HeLaRC32.

Для подтверждения того, что в способе отбора из библиотеки получены полезные новые клоны, по две репрезентативные конструкции для каждого из иницирующих кодонов ATG, CTG, GTG, и по одной репрезентативной конструкции для TAG и TGA, соответственно, выбрано для рекомбинации в стабильный бакуловирусный клон (таблица 1). Эти конструкции использовали для определения соотношения субъединиц и активности вирусного капсида. Кроме того, авторы настоящего изобретения хотели

подтвердить, что конструкции с иницирующим кодоном ATG образуют AAV с высокими уровнями и активностью.

SEQ ID NO.		
74	Конструкция AAV5	CTATAAAT <u>ATGGTCTCTTTT</u>
1	ATG1	CTCGATGCATGGTAAGCTTT
31	ATG2	CTGTCGTCATGGTGTCTGTTT
63	CTG1	CTCGTGCCCTGGCTTCGTTT
64	CTG2	CTTGATGTCTGGCCACTTTT
65	GTG1	CTTCCACTGTGGCCTCCTTT
66	GTG2	CTTCCGCCGTGGCGTCGTTT
67	TAG1	CTGCCCCCTAGGACCGTTT
68	TGA1	CTTCACCCTGAGCGCAATTT

Таблица 2. Уникальные иницирующие кодоны с их контекстными последовательностями для получения бакуловируса.

Уникальные контексты последовательностей иницирующего кодона (иницирующий кодон VP1 подчеркнут) выбирали и клонировали в качестве замены в последовательности экспрессирующей AAV5 конструкции (SEQ ID NO:70 и 74, где SEQ ID NO:74 соответствует н. 148-167). SEQ ID NO:31 являлся преобладающим отобранным клоном и идентифицирован из библиотеки с MOI 5. Для каждого кандидата получили несколько клонов и анализировали экспрессию VP капсида (фигура 3). Для иницирующих кодонов со связанным с ними контекстом получены изменчивые степени успеха при получении капсидов AAV с хорошим стехиометрическим соотношением. Следует отметить, что, в большинстве случаев, тестировали по три клон на конструкцию для определения того, является ли клон бакуловируса стабильным. В этом отношении, для ATG1 получен один стабильный продуцент (вторая дорожка для ATG1 на фигуре 3). Для ATG2 присутствовало множество стабильных продуцентов, все с хорошим стехиометрическим соотношением. Для конструкции CTG1 не удалось получить продукции, в то время как для CTG2 получена продукция капсидов со стехиометрическим соотношением, сходным с тем, как описано в Международной патентной заявке WO2015/137802 (данные не представлены). Подобным образом, для GTG2 также показано хорошее стехиометрическое соотношение, в то время как для TAG (стоп-кодона) получена продукция в очень низких количествах, и для TGA (стоп-кодона) получена продукция капсида с меньшим количеством VP1. Таким образом, неожиданно подтверждено, что авторы настоящего изобретения были способны получить эффективные конструкции капсида AAV, т.е. AAV5, где ATG использован в качестве иницирующего кодона, имеющие хорошее стехиометрическое соотношение.

Стабильный клон конструкций для каждого из иницирующих кодонов отобрали и использовали для продукции AAV, несущего репортерный ген SEAP под контролем

промотора CMV. Для всех трех конструкций AAV получены титры (гк/мл) в сходном диапазоне. После титрования, авторы настоящего изобретения трансдуцировали клетки как Huh7, так и HeLa, при трех различных MOI и определяли активность SEAP через 48 часов (фигуры 5A и 5B). Поразительно, что для двух конструкций с иницирующим кодоном ATG получены капсиды со сходной или несколько улучшенной активностью, по сравнению с CTG и GTG, в то время как для капсида, лишённого VP1 (TGA), не получено различимой активности SEAP выше фона, как и ожидали. Доказательство, подтверждающее, что валин может улучшать активность, предоставлено тем фактом, что доминирующие уникальные клоны, идентифицированные в таблице 1, кодируют валин в положении 2. Эти результаты согласовывались с наблюдениями из фигуры 3, где для этих капсидов показано стехиометрическое соотношение VP1:VP2:VP3, очень сходное с конструкциями CTG и GTG.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Конструкция нуклеиновой кислоты, содержащая последовательности для контроля экспрессии, для экспрессии в клетке насекомого нуклеотидной последовательности, содержащей открытую рамку считывания, где последовательность открытой рамки считывания кодирует:

- i) капсидные белки VP1, VP2 и VP3 аденоассоциированного вируса (AAV); и
- ii) иницирующий трансляцию кодон ATG для VP1;

где указанная нуклеотидная последовательность содержит, выше открытой рамки считывания, альтернативный иницирующий кодон, находящийся вне рамки применительно к открытой рамке считывания.

2. Конструкция нуклеиновой кислоты по п.1, где альтернативный иницирующий кодон выбран из группы, состоящей из CTG, ATG, ACG, TTG, GTG, CTC и CTT.

3. Конструкция нуклеиновой кислоты по п.1 или п.2, где указанная нуклеотидная последовательность содержит альтернативную открытую рамку считывания, начинающуюся на альтернативном иницирующем кодоне, включающую указанный иницирующий трансляцию кодон ATG для VP1.

4. Конструкция нуклеиновой кислоты по п.3, где альтернативная открытая рамка считывания после альтернативного иницирующего кодона кодирует пептид из вплоть до 20 аминокислот.

5. Конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-4, где нуклеотидная последовательность, смежная с открытой рамкой считывания и содержащая альтернативный иницирующий кодон, представляет собой нуклеотидные остатки 1-8 из SEQ ID NO. 1.

6. Конструкция нуклеиновой кислоты по п.5, где открытая рамка считывания, содержащая иницирующий трансляцию кодон ATG для VP1, имеет нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO:1, где остатки в положениях 9-11 представляют собой иницирующий трансляцию кодон ATG для VP1.

7. Конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-6, где второй кодон открытой рамки считывания кодирует аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из аланина, глицина, валина, аспарагиновой кислоты и глутаминовой кислоты.

8. Конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-7, где капсидные белки AAV представляют собой капсидные белки серотипа AAV.

9. Конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-8, где конструкция нуклеиновой кислоты содержит промотор, выбранный из группы, состоящей из: промотора полиэдрина, промотора p10, 4xHsp27 EcRE+ минимального промотора Hsp70, промотора deltaE1 и промотора E1.

10. Конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-9, где конструкция нуклеиновой кислоты представляет собой бакуловирусный вектор.

11. Клетка насекомого, содержащая конструкцию нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-10.

12. Клетка насекомого по п.11, дополнительно содержащая:

(а) вторую нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность инвертированного концевой повтора (ITR) AAV;

(b) третью нуклеотидную последовательность, содержащую кодирующую последовательность Rep78 или Rep68, функционально связанную с последовательностями для контроля экспрессии, для экспрессии в клетке насекомого;

(с) необязательно, четвертую нуклеотидную последовательность, содержащую кодирующую последовательность Rep52 или Rep40, функционально связанную с последовательностями для контроля экспрессии, для экспрессии в клетке насекомого.

13. Способ получения AAV в клетке насекомого, включающий стадии: (а) культивирования клетки насекомого, как определено по п.11 или п.12, в таких условиях, чтобы происходила продукция AAV; и необязательно (b) выделения AAV.

14. Способ получения конструкции нуклеиновой кислоты, кодирующей парвовирусный капсидный белок, где указанная конструкция нуклеиновой кислоты имеет одно или несколько улучшенных свойств, включающий:

а) получение множества конструкций нуклеиновой кислоты, где каждая конструкция содержит:

нуклеотидную последовательность, кодирующую парвовирусный капсидный белок, функционально связанную с последовательностью для контроля экспрессии, и по меньшей мере одну последовательность парвовирусного инвертированного концевой повтора (ITR), фланкирующую указанную нуклеотидную последовательность, кодирующую парвовирусный капсидный белок, функционально связанную с последовательностью для контроля экспрессии;

b) перенос множества конструкций нуклеиновой кислоты в клетки насекомых, способные экспрессировать парвовирусный белок Rep;

с) воздействие на клетки насекомых условий, обеспечивающих экспрессию парвовирусного капсидного белка и парвовирусного белка гер, таким образом, что конструкции нуклеиновой кислоты можно упаковывать в парвовирусные капсиды для получения парвовирусных вирионов;

d) выделение парвовирусных вирионов из клеток насекомых и/или супернатанта клеток насекомых;

e) приведение указанных парвовирусных вирионов в контакт с клеткой-мишенью для обеспечения инфекции клетки-мишени;

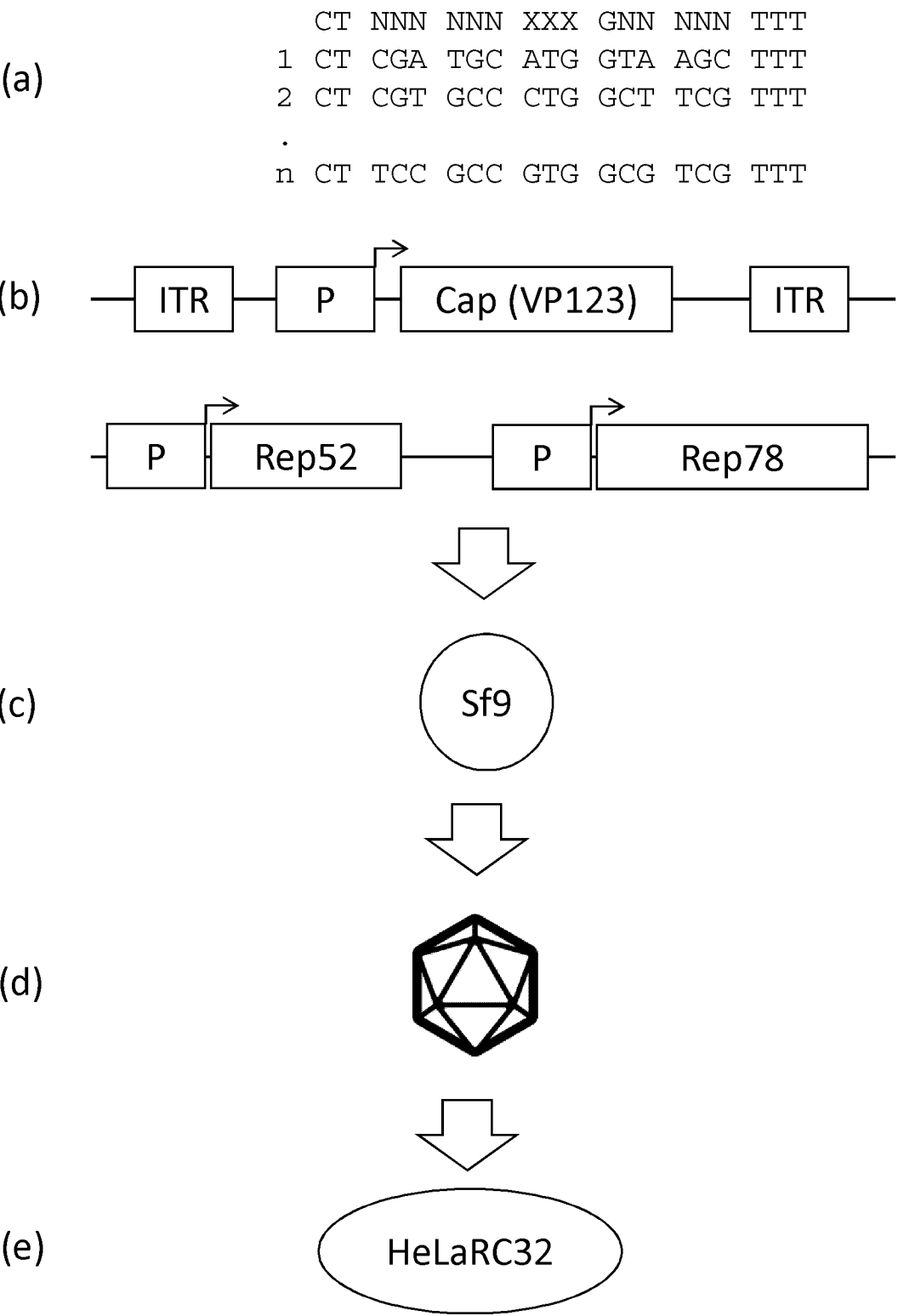
f) выделение конструкций нуклеиновой кислоты из клеток-мишеней.

15. Способ по п.14, где конструкции нуклеиновой кислоты, как определено на стадии а), содержатся в бакуловирусных векторах.

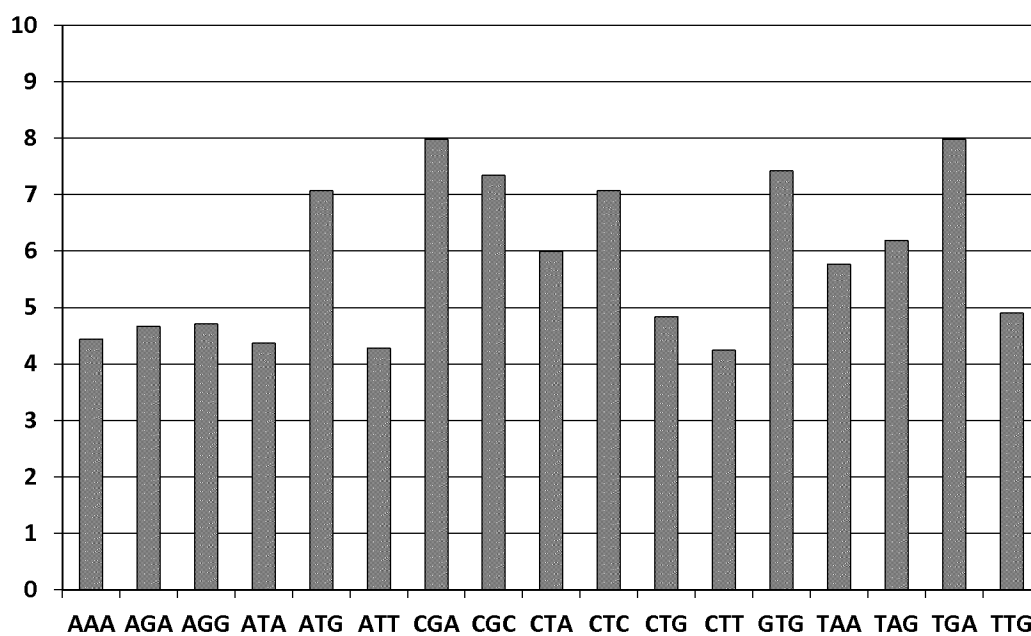
16. Способ по п.14 или п.15, дополнительно включающий стадию g) получения конструкции нуклеиновой кислоты для получения генотерапевтического вектора, содержащего нуклеотидную последовательность, кодирующую парвовирусный капсидный белок, функционально связанную с последовательностью для контроля

экспрессии, выделенной на стадии f).

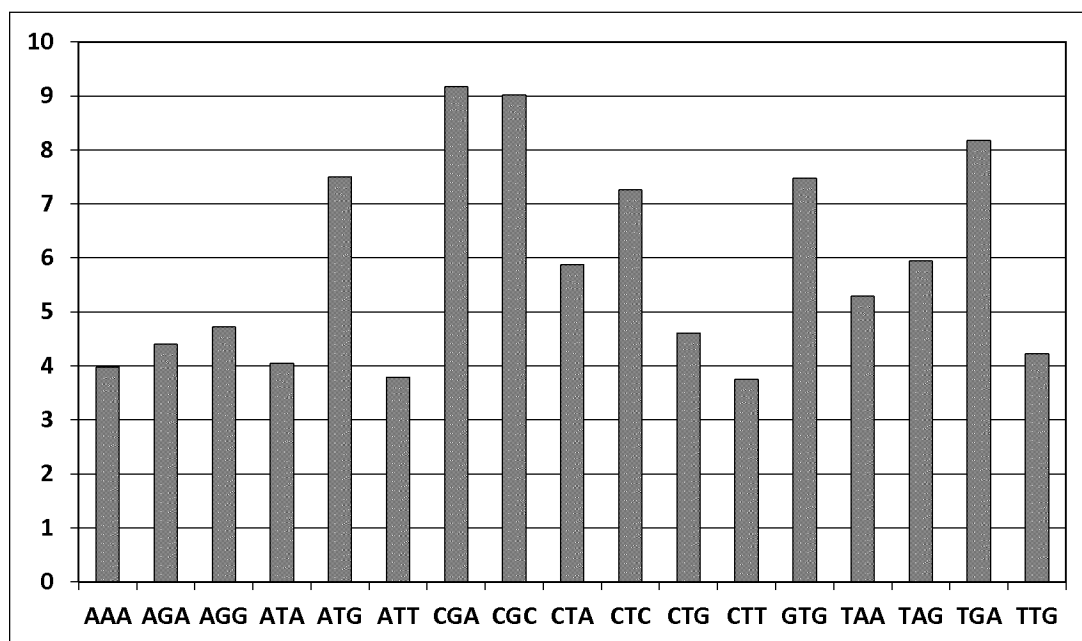
ФИГ. 1



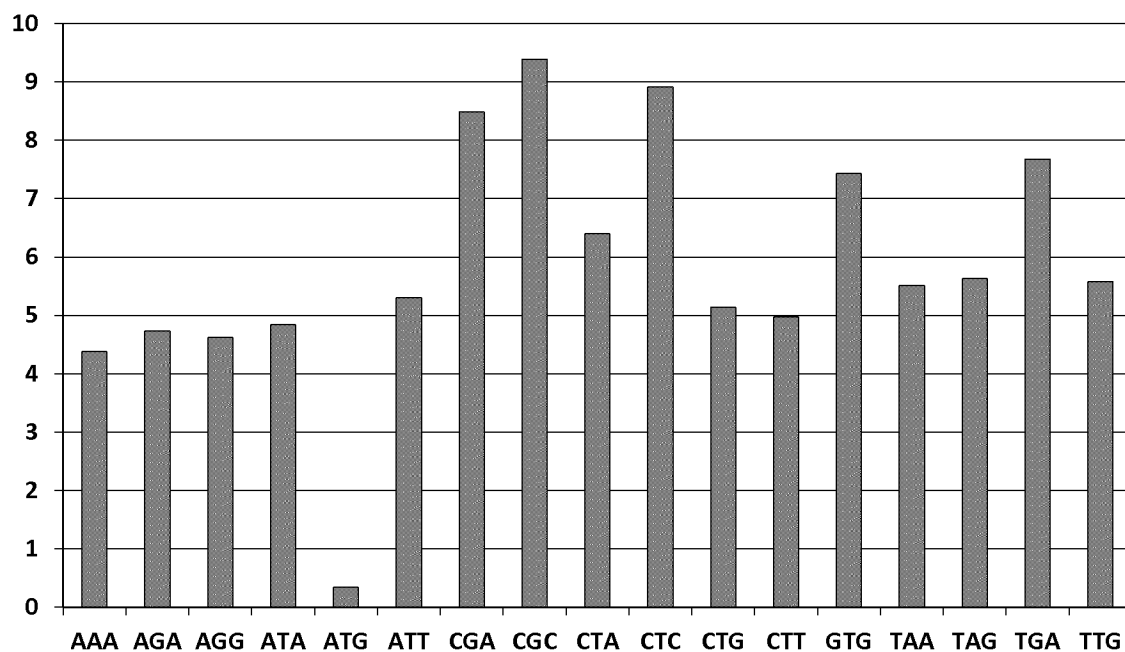
ФИГ. 2А



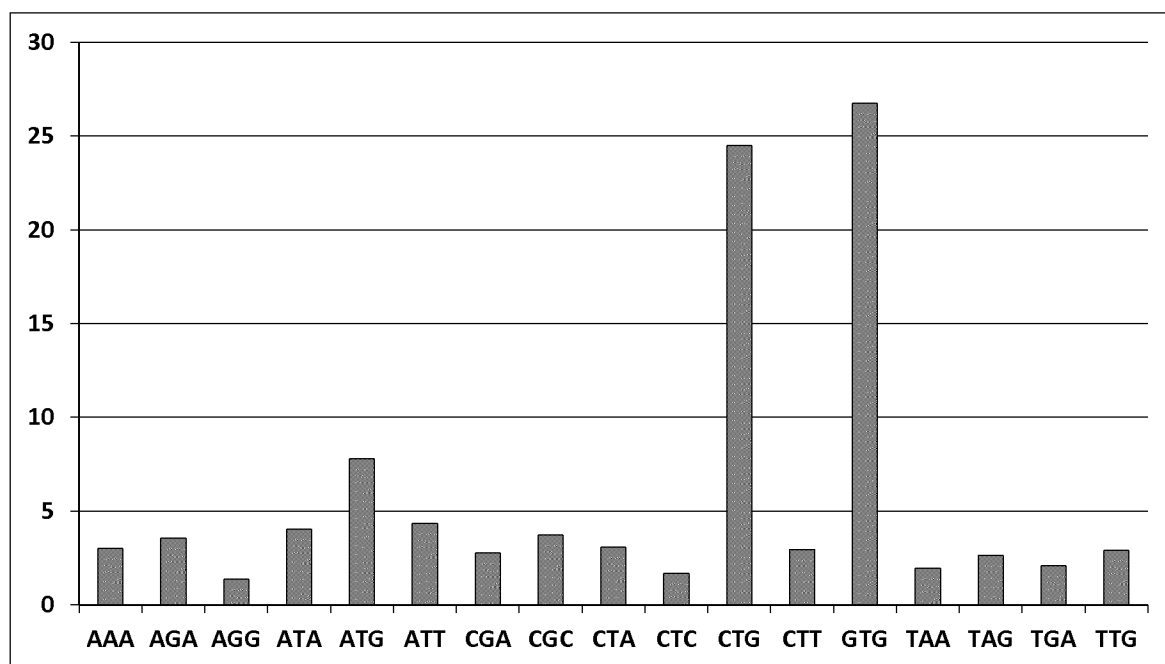
ФИГ. 2В



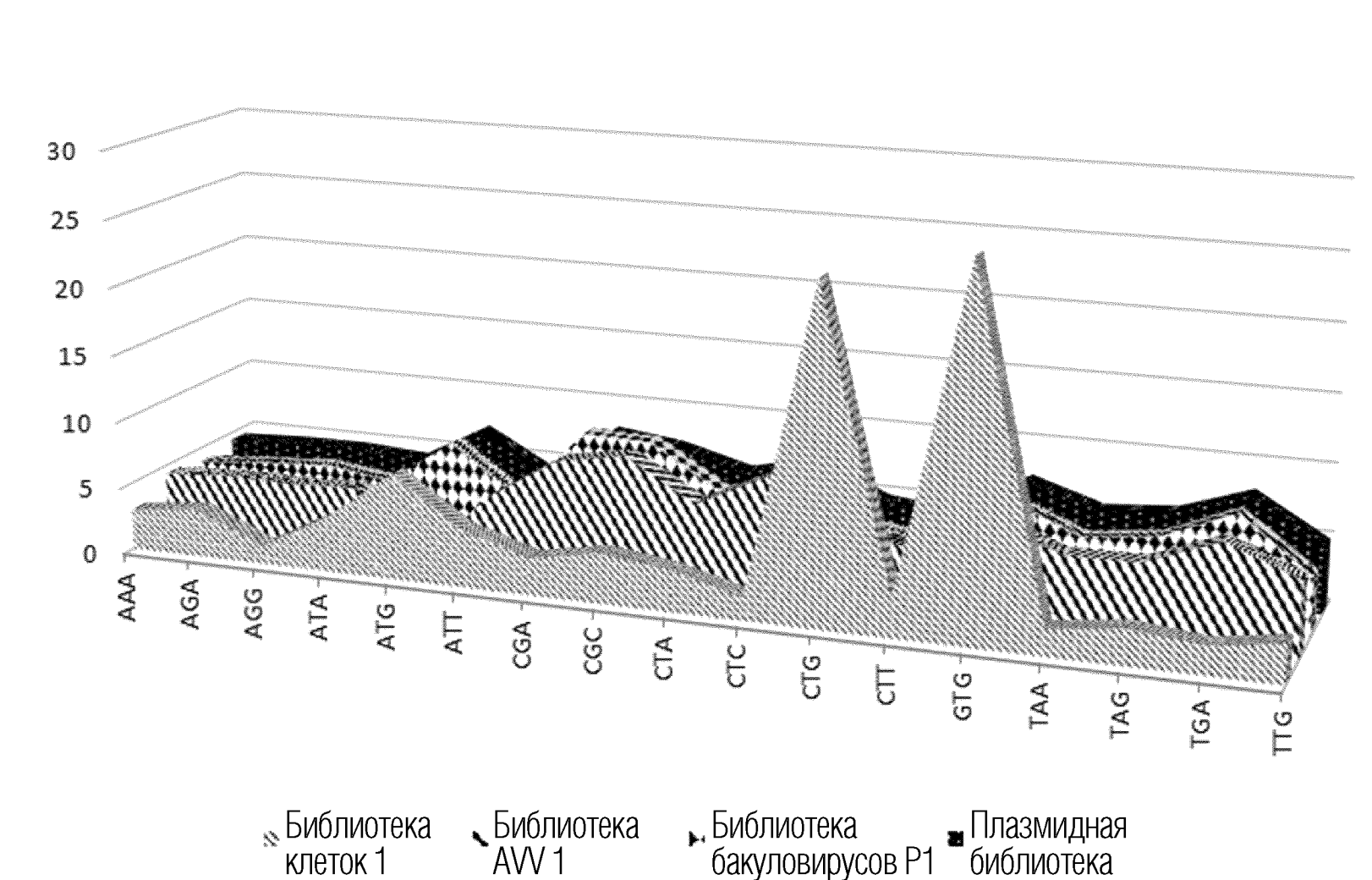
ФИГ. 2С



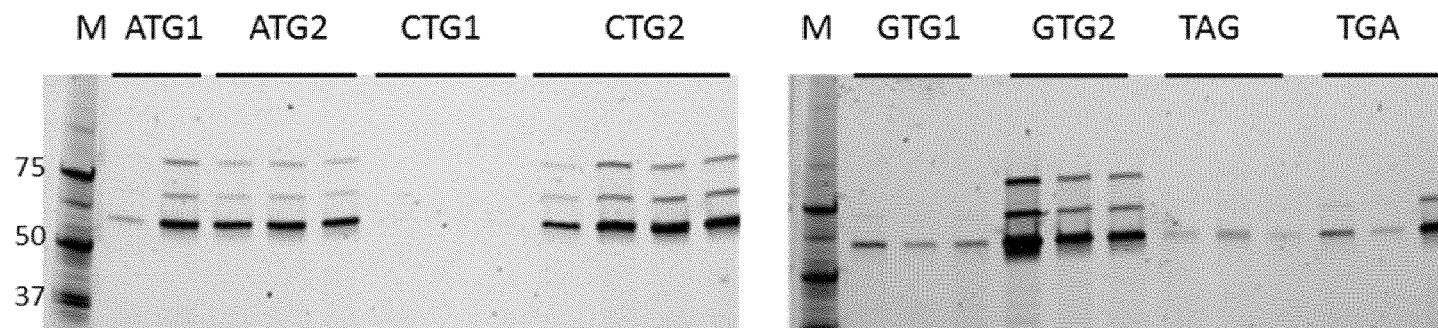
ФИГ. 2D



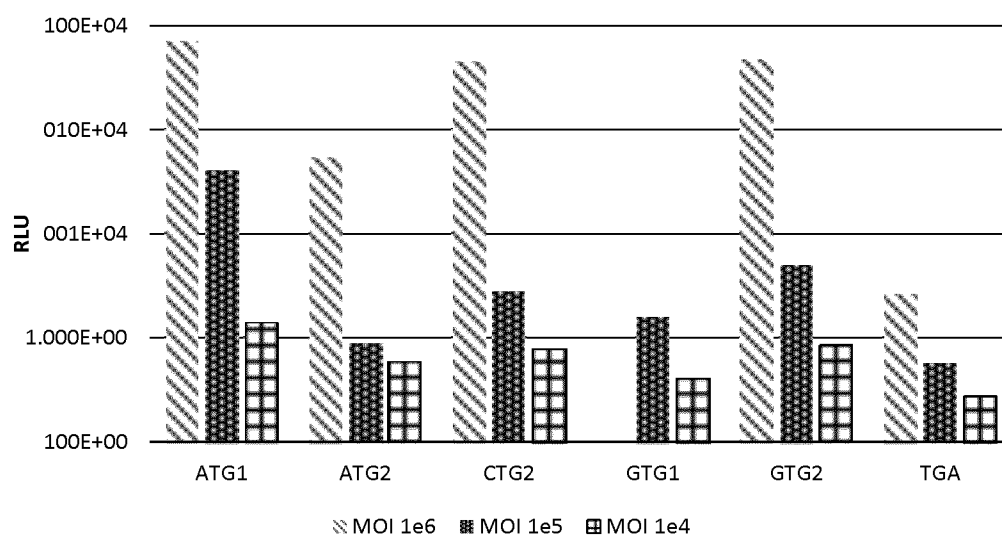
ФИГ. 2Е



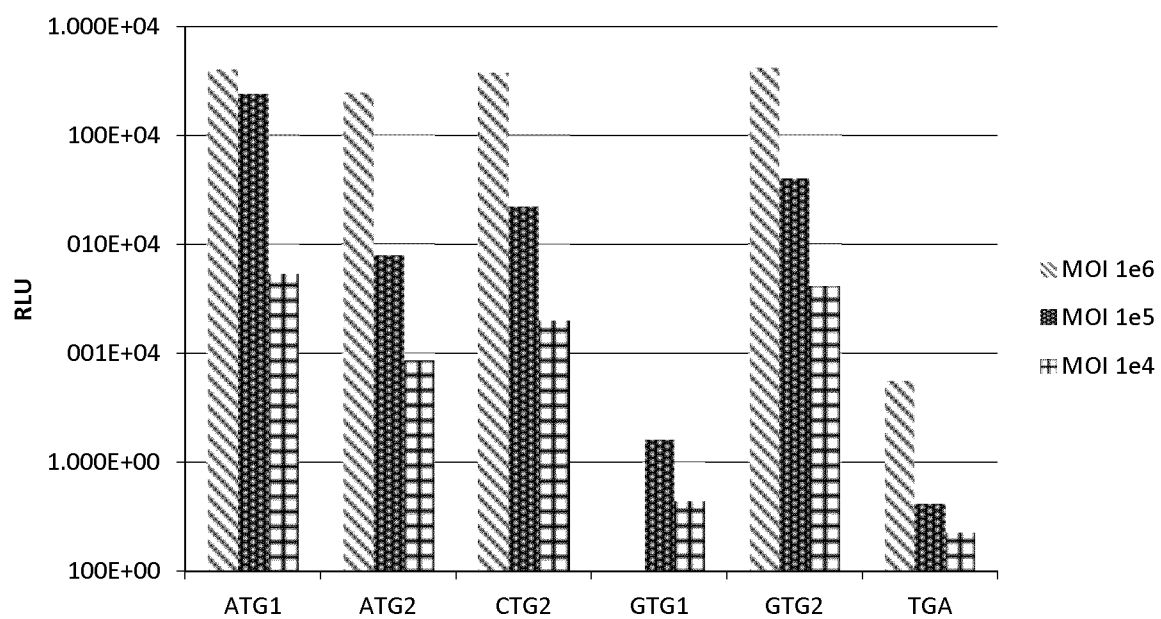
ФИГ. 3



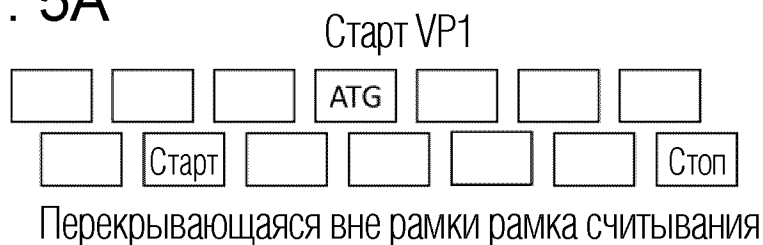
ФИГ. 4А



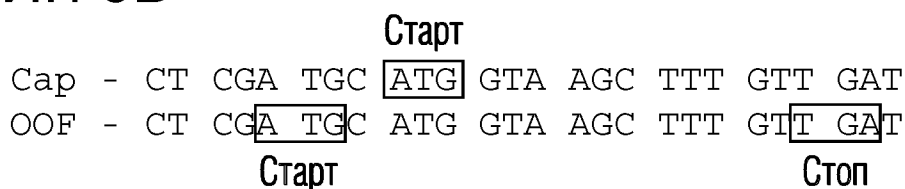
ФИГ. 4В



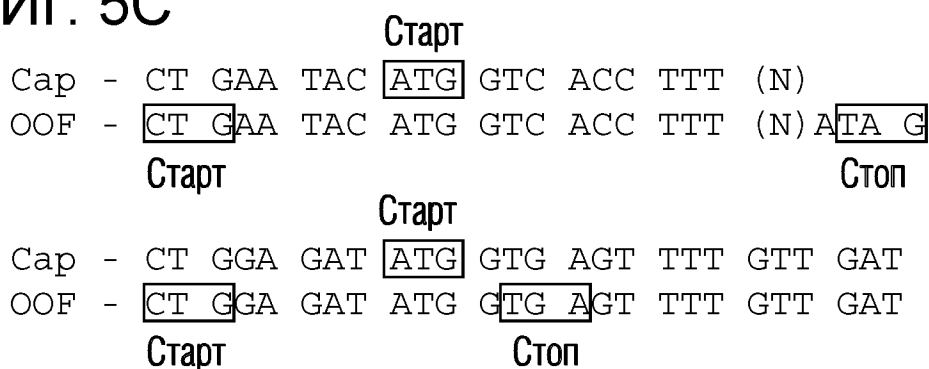
ФИГ. 5А



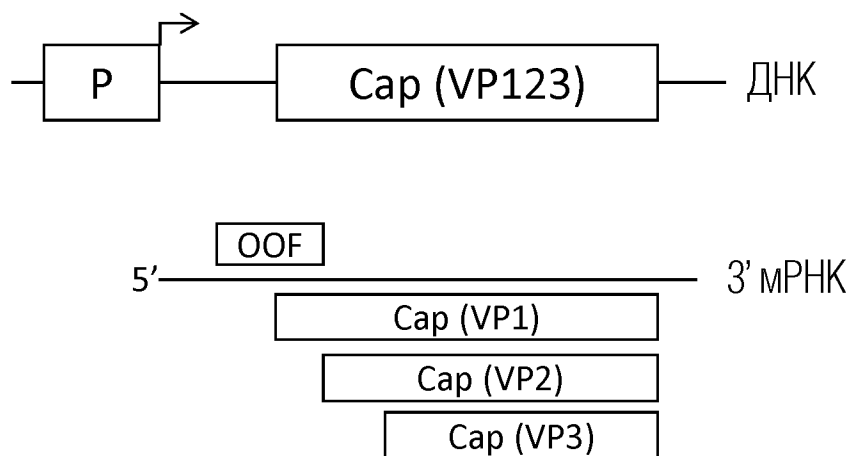
ФИГ. 5В



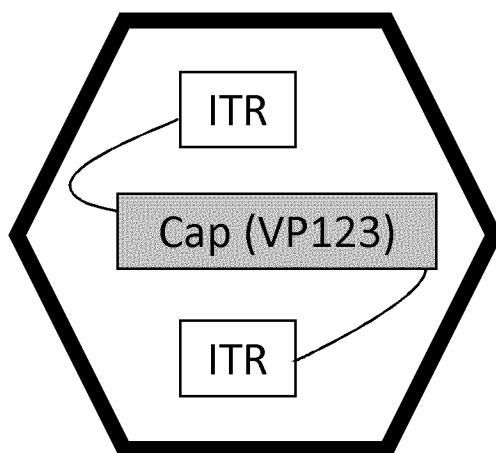
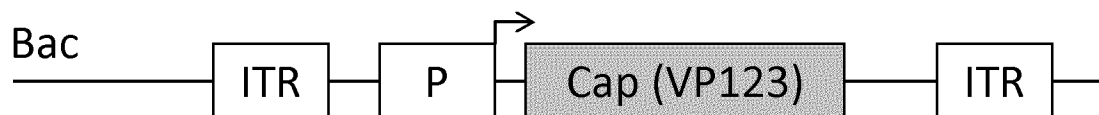
ФИГ. 5С



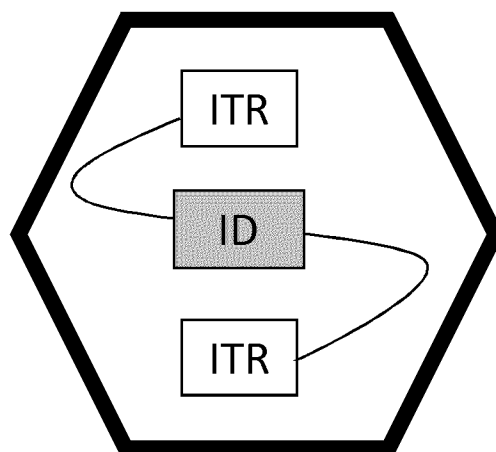
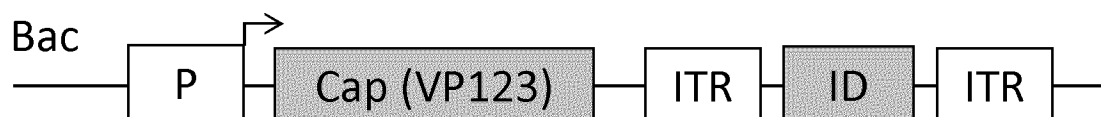
ФИГ. 5D



ФИГ. 6А



ФИГ. 6В



ФИГ. 6С

